

Generierung rekombinanter Antikörper gegen das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Martina Inga Kirsch
aus Heidelberg

| | |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. Stefan Dübel |
| 2. Referentin: | Professor Dr. Petra Dersch |
| eingereicht am: | 19.09.2007 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 14.11.2007 |

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Hülseweh B., Kirsch M.I., Nacke C., Hust M., Dübel S. & Marschall H.-J.: Single-chain antibody fragments (scFvs) as novel and specific tool for B-Detection. (Poster) 9th CBW Protection Symposium, Mai 2007. Göteborg, Schweden.

Kirsch M.I., Hülseweh B., Nacke C., Schirrmann T., Hust M., Marschall H.-J. & Dübel S.: Selection of human antibody fragments against VEEV using different panning strategies. (Poster) IBC's 17th Annual International Conference Antibody Engineering, Dezember 2006. San Diego, USA.

Kirsch M., Hülseweh, B., Hust M., Marschall H.-J. & Dübel S.: Isolation of single-chain antibody fragments against Alphaviruses. (Poster) Biological Medical Defense Conference 2005, Oktober 2005. München.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dübel für die Möglichkeit zur Promotion und die wissenschaftliche Betreuung.

Bei Frau Prof. Dr. Dersch bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Korte danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Herrn Dr. Michael Hust, Herrn Dr. Thomas Schirrmann und Herrn Dr. Michael Mersmann bedanke ich mich für die tolle Unterstützung, die hilfreichen Beiträge sowie für die Korrektur meiner Arbeit. Ihnen und allen anderen Arbeitskollegen des Instituts für Biochemie und Biotechnologie danke ich für die tollste Arbeitsatmosphäre, die es geben kann. Mein Dank gilt ebenfalls Christoph Nacke für die praktische Unterstützung bei den Experimenten.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Birgit Hülseweh der Abteilung Virologie des wehrwissenschaftlichen Instituts für die weitreichende Unterstützung, insbesondere während meiner Aufenthalte in Munster, sowie die Durchsicht meiner Arbeit. Den weiteren Mitarbeitern der Abteilung Virologie, vor allem Herrn Dr. Marschall und Frau Voß, danke ich für die angenehmen Aufenthalte in Munster sowie die umfangreiche Bereitstellung des Virusmaterials.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die liebevolle Unterstützung bei der Umsetzung all meiner Pläne.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Antikörper und Antikörperfragmente | 1 |
| 1.2 | Phagen-Display-Technologie | 3 |
| 1.2.1 | Der Bakteriophage M13 | 3 |
| 1.2.2 | Prinzip des Phagen-Display | 4 |
| 1.2.3 | Antikörpergenbibliotheken | 7 |
| 1.2.4 | Isolierung virusspezifischer Antikörper mittels Phagen-Display | 7 |
| 1.2.5 | Affinitätsreifung rekombinanter Antikörperfragmente | 8 |
| 1.3 | Alphaviren | 9 |
| 1.3.1 | Die Biologie der Alphaviren | 9 |
| 1.3.2 | Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) | 11 |
| 1.3.3 | Historie der Generierung von Antikörpern gegen VEEV | 12 |
| 1.4 | Zielsetzung | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1 | Material | 14 |
| 2.1.1 | Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.1.2 | Geräte | 14 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 15 |
| 2.1.4 | Puffer und Lösungen | 16 |
| 2.1.5 | Nährmedien und Supplemente | 18 |
| 2.1.5.1 | Prokaryotische Kultivierung | 18 |
| 2.1.5.2 | Eukaryotische Kultivierung | 19 |
| 2.1.6 | Bakterienstämme und Bakteriophagen | 19 |
| 2.1.7 | Zelllinien und Virusstämme | 19 |
| 2.1.8 | Plasmide | 20 |
| 2.1.9 | Oligonukleotide | 20 |
| 2.1.10 | Enzyme | 21 |
| 2.1.11 | Antikörper | 21 |
| 2.1.12 | Kit-Systeme | 21 |
| 2.1.13 | Computerprogramme und Datenbanken | 22 |
| 2.1.14 | Sonstiges | 22 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 23 |
| 2.2.1 | Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels PCR | 23 |
| 2.2.2 | Gelelektrophoretischer DNA-Nachweis | 23 |
| 2.2.3 | Reinigung von DNA-Fragmenten mittels <i>Purification Kit</i> | 24 |
| 2.2.4 | Präzipitation von DNA-Fragmenten | 24 |
| 2.2.5 | Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen | 24 |
| 2.2.6 | Enzymatische Restriktion von DNA | 24 |
| 2.2.7 | Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen | 25 |
| 2.2.8 | Ligation von DNA-Fragmenten | 25 |
| 2.2.9 | Präparation von Plasmid-DNA mittels <i>Kit</i> | 26 |
| 2.2.10 | Präparation von Plasmid-DNA mit anschließender CTAB-Fällung | 26 |
| 2.2.11 | DNA-Sequenzierung | 26 |
| 2.3 | Mikrobiologische Methoden | 27 |
| 2.3.1 | Anlegen von Glycerinstocks | 27 |
| 2.3.2 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 27 |
| 2.3.3 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 27 |
| 2.3.4 | Elektroporation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3.5 | Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus Antikörpergenbibliotheken | 28 |
| 2.3.5.1 | Selektion mit den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson (I+J) | 28 |
| 2.3.5.2 | Selektion mit der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 | 29 |
| 2.3.5.3 | Selektion mit der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V _H | 30 |
| 2.3.6 | Infektion von <i>E. coli</i> -Zellen mit eluierten Phagen | 32 |
| 2.3.7 | Produktion von scFv-präsentierenden Phagen | 32 |
| 2.3.8 | Titerbestimmung von M13-Phagen | 33 |
| 2.3.9 | Produktion von scFv oder scFv-pIII-Fusionsproteinen | 33 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 34 |
| 2.4.1 | Kultivierung von HEK293T-Zellen | 34 |
| 2.4.2 | Transfektion von HEK293T-Zellen | 34 |
| 2.5 | Biochemische Methoden | 34 |
| 2.5.1 | Reinigung der scFv-Fc-Fusionsproteine über Protein A | 34 |
| 2.5.2 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford | 35 |
| 2.5.3 | Konzentrationsbestimmung der scFv-Fc-Fusionsproteine mittels <i>Human-Capture</i> -ELISA | 35 |
| 2.5.4 | Antigen-ELISA | 36 |
| 2.5.5 | Bestimmung der Kreuzreaktivität mittels Sandwich-ELISA | 36 |
| 2.5.6 | SDS-PAGE | 37 |
| 2.5.7 | Silberfärbung | 38 |
| 2.5.8 | Coomassiefärbung von Proteinen | 38 |
| 2.5.9 | Western Blot | 38 |
| 2.5.10 | Immunfärbung | 38 |
| 2.5.11 | Immunhistochemische Färbung VEEV-infizierter Verozellen | 39 |
| 2.5.12 | Bestimmung der Dissoziationskonstante K _D VEEV-spezifischer Antikörper mittels Oberflächenplasmonresonanz | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Gewinnung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus den Antikörpergenbibliotheken Tomlinson (I+J) und Heidelberg | 41 |
| 3.1.1 | Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente | 41 |
| 3.1.2 | Analyse von Einzelklonen | 43 |
| 3.1.3 | Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen der selektierten Antikörperfragmente | 44 |
| 3.1.4 | Spezifitätsbestimmung der scFv-Fc-Fusionsproteine | 45 |
| 3.2 | Gewinnung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 | 46 |
| 3.2.1 | Strategien zur Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente | 46 |
| 3.2.2 | Selektionen VEEV-spezifischer Antikörperfragmente | 48 |
| 3.2.3 | Analyse von Einzelklonen | 51 |
| 3.3 | Charakterisierung der selektierten VEEV-spezifischen Antikörperfragmente | 53 |
| 3.3.1 | Produktion von monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen VEEV-spezifischer Klone | 53 |
| 3.3.2 | Antigen-ELISA mit VRS-konzentriertem VEEV-TC83 | 54 |
| 3.3.3 | Nachweis von VEEV-Proteinen im Lysat infizierter Verozellen | 55 |
| 3.3.4 | Bestimmung der Kreuzreaktivität der isolierten Antikörperfragmente | 56 |
| 3.3.5 | Immunhistochemische Färbung VEEV-infizierter Verozellen | 58 |
| 3.3.6 | Immunfärbung von Virusproteinen | 59 |
| 3.3.7 | Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen | 61 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.8 | Nachweis von VRS-konzentriertem VEEV-TC83 mit scFv-Fc-Fusionsproteinen | 61 |
| 3.3.9 | Immunfärbung von Virusproteinen mit den generierten scFv-Fc-Fusionsproteinen | 62 |
| 3.4 | Affinitätsreifung des Antikörperfragments MK220-IG12 | 63 |
| 3.4.1 | Erstellung der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V _H | 63 |
| 3.4.2 | Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit ausgetauschter V _L | 64 |
| 3.4.3 | Analyse von Einzelklonen | 67 |
| 3.5 | Bestimmung der Dissoziationskonstante K _D des WIS-Antikörpers 8/6 | 69 |
| 4 | Diskussion | 71 |
| 4.1 | VEEV-spezifische Antikörperfragmente aus universellen Antikörpergenbibliotheken | 71 |
| 4.1.1 | Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus universellen Antikörpergenbibliotheken | 71 |
| 4.1.2 | Sequenzvergleich der isolierten Antikörperfragmente | 73 |
| 4.1.3 | Charakterisierung der isolierten Antikörperfragmente | 74 |
| 4.2 | V _L -Kettenaustausch des Antikörperfragments MK220-IG12 | 79 |
| 4.2.1 | Die Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V _H | 79 |
| 4.2.2 | Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit V _L -Austausch | 80 |
| 4.2.3 | Sequenzvergleich und Charakterisierung der isolierten Antikörperfragmente | 81 |
| 4.3 | Bestimmung der Dissoziationskonstante K _D des WIS-Antikörpers 8/6 mit VEEV-Partikeln | 83 |
| 4.4 | Ausblick | 84 |
| 5 | Zusammenfassung | 85 |
| | Summary | 86 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 7 | Anhang | 100 |
| 7.1 | Zusätzliche Daten | 100 |
| 7.1.1 | Vektorkarten | 100 |
| 7.1.2 | Keimbahnlinien der VEEV aus den Antikörpergenbibliotheken | |
| 7.1.3 | Heidelberg und Tomlinson (I+J) | 102 |
| 7.1.4 | Phagentiter der monoklonalen Phagenpräparationen | 103 |
| 7.1.5 | Antigen-ELISA mit inaktiviertem VEEV-TC83 | 103 |

| | |
|----------------|--|
| A | Absorption |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| Ak | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| BHK | <i>Baby hamster kidney</i> |
| bla | β -Laktamase-Gen |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| cDNA | Kodierende DNA |
| CDR | <i>Complementary determining region</i> |
| cfu | <i>Colony forming unit</i> |
| C _H | Konstante Domäne der schweren IgG-Kette |
| CHIKV | Chikungunyavirus |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CTAB | Cethyltrimethylammoniumbromid |
| DAB | 2,2-Diaminobenzidin |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleotidtriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraacetat |
| EEEV | Östliches Pferdeenzephalitis-Virus |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| _f | <i>Forward</i> |
| Fab | <i>Fragment antigen binding</i> |
| Fc | <i>Fragment crystallizable</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| fd | Zwei N-terminalen Domänen einer schweren IgG-Kette |
| Fv | Variables Fragment |
| g | Gramm |
| xg | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HC | Schwere Antikörperkette |
| HEK | <i>Human embryonic kidney</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IPTG | Isopropyl-b-D-Thiogalaktopyranosid |
| Kan | Kanamycin |
| kB | Kilobasen |
| kBp | Kilobasenpaare |
| kD | Kilodalton |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| KID | Kulturinfektiöse Dosis |
| kV | Kilovolt |
| LC | Leichte Antikörperkette |
| M | Molar |
| M13 | M13K07; Filamentöser Phage |
| mAk | Monoklonaler Antikörper |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| mL | Milliliter |

| | |
|-------------------|---|
| mRNA | Messenger RNA |
| µg | Mikrogramm |
| µL | Mikroliter |
| N | Normal |
| nm | Nanometer |
| NBT | Nitroblue Tetrazolium |
| NCPV | <i>National Collection of Pathogenic Viruses, UK</i> |
| NK | Negativkontrolle |
| N-terminal | Aminogruppen-terminal |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| pAk | Polyklonaler Antikörper |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| Phage | Bakteriophage |
| phOx | Hapten-2-Phenyl-2-oxalin-5-on |
| POD | Meerrettichperoxidase |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| _r | <i>Reverse</i> |
| RBS | Ribosomale Bindungsstelle |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| rpm | <i>Rotations per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RU | <i>Response unit</i> |
| SARS | <i>Severe acute respiratory syndrome</i> |
| scFab | <i>Single chain Fab</i> |
| scFv | <i>Single chain Fragment variable</i> |
| scFv-Fc | <i>Single chain Fragment variable-Fragment crystallizable</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SN | Überstand |
| s | Sekunde |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| T | Tetracyclin |
| TY | Trypton-Yeast-Medium |
| U | <i>Unit</i> |
| ÜNK | Übernachtskultur |
| UK | <i>United Kingdom</i> |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VEEV | Venezuelanisches Pferdeenzephalitis-Virus |
| Vero | <i>African green monkey kidney</i> |
| V _H | Variabler Teil der schweren Antikörperkette |
| V _L | Variabler Teil der leichten Antikörperkette |
| VRS | <i>Virus recovery system</i> |
| v/v | <i>Volume to volume</i> |
| WEEV | Westliches Pferdeenzephalitis-Virus |
| WIS | Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien der Bundeswehr |
| w/v | <i>Weight to volume</i> |

1 Einleitung

1.1 Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, sind ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort bei *Gnathostomata*. Diese Moleküle binden spezifisch an in den Körper eingedrungene Fremdstoffe, z. B. Krankheitserreger oder Toxine, und aktivieren dadurch weitere Moleküle oder Zellen des Immunsystems. Abhängig von der an dieser Markierung beteiligten Antikörperklasse können nun Neutralisierung, Opsonierung, Aktivierung des Komplementsystems sowie weitere Reaktionskaskaden folgen. Insgesamt gibt es fünf Antikörperklassen (Isotypen) IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die sich in Struktur und Eigenschaften voneinander unterscheiden. Die häufigste Antikörperklasse IgG macht ca. 80 Prozent aller Immunglobuline im humanen Serum aus. Antikörper dieses Isotyps haben eine molekulare Masse von ca. 150 kD. Sie bestehen aus zwei identischen schweren (HC) und zwei identischen leichten Polypeptidketten (LC), die über Disulfidbrücken und nicht kovalente Wechselwirkungen verknüpft sind (Abb. 1.1). Am N-Terminus aller Ketten liegen die variablen Regionen des Immunglobulins. Diese Bereiche bestehen aus hypervariablen Domänen (CDR) und Gerüstregionen, wobei hauptsächlich die erstgenannten für die Antigenerkennung verantwortlich sind. Die Gerüstregionen (*framework*) stabilisieren die räumliche Struktur der variablen Bereiche. Neben diesen variablen Bereichen beinhalten die leichten Ketten noch die konstante Domäne C_L. Innerhalb der schweren Kette befinden sich drei konstante Immunglobulindomänen C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}. Im Bereich der C_{H2} befindet sich die für die Auslösung von Effektorfunktionen essentielle Glykosylierung. Die Domänen C_{H1} und C_{H2} sind über einen flexiblen Bereich der schweren Ketten, die *hinge*-Region, miteinander verbunden. Dort sind Cysteine lokalisiert, deren Seitenketten miteinander intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten ausbilden.

Für einige Anwendungen von Immunglobulinen sind kleinere Moleküle von Vorteil. Durch enzymatische Behandlung eines IgG-Moleküls mit Papain entstehen zwei antigenbindende Fragmente. Diese auch Fab genannten Moleküle setzen sich jeweils aus der kompletten leichten Kette sowie den zwei N-terminalen Domänen der schweren Kette, V_H und C_{H1}, zusammen. Die zwei Polypeptidketten dieses Moleküls sind über eine Disulfidbrücke verbunden (Janeway *et al.*, 2002).

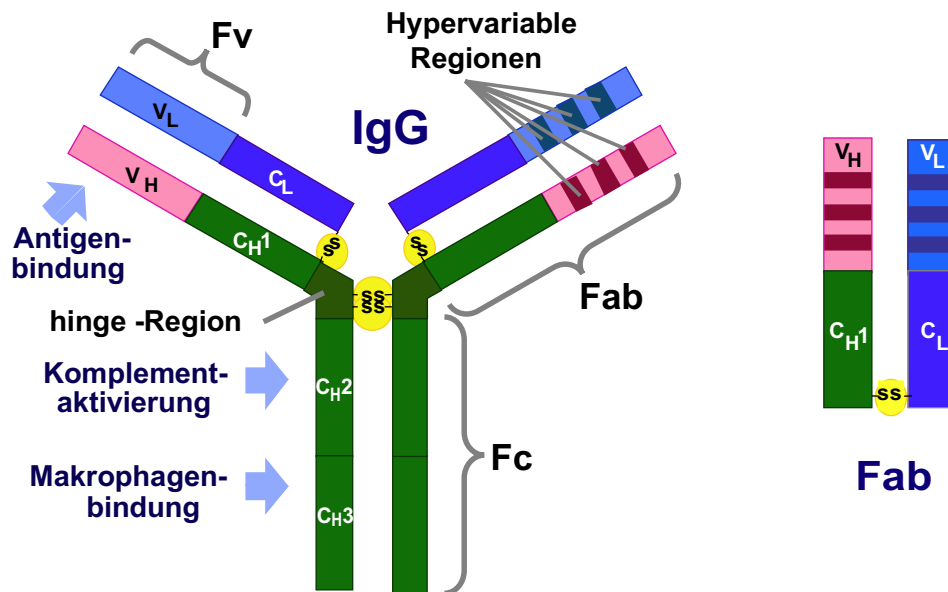


Abb. 1.1: Struktur eines IgG- und Fab-Moleküls

Schematische Darstellung eines IgG und Fab mit Bezeichnung der einzelnen Regionen: C_H1-C_H3: konstante Regionen; V_H: variable Region der schweren Kette; V_L: variable Region der leichten Kette; C_L: konstante Domäne der leichten Kette; -SS-: Disulfidbindung.

Mit Hilfe der Gentechnik können heute noch kleinere Antikörperfragmente als das Fab rekombinant hergestellt werden, die modular aus Immunglobulindomänen aufgebaut sind. So sind die Fragmente scFv (*single chain fragment variable*) und Fv mit einer Molekularmasse von ca. 28 kD weitere Formen eines funktionellen Antikörpers. Diese Moleküle bestehen aus den variablen Regionen der schweren und der leichten Kette, die beim scFv über ein 15-25 Aminosäuren langes Peptid kovalent verbunden und somit stabilisiert vorliegen (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988) (Abb. 1.2). Eine noch höhere Stabilität besitzen scFv-Fc-Fusionsproteine, bei welchen jeweils ein scFv über eine *hinge*-Region mit den konstanten Domänen C_H2 und C_H3 eines IgG-Moleküls verbunden ist (Kato *et al.*, 1995) (Abb. 1.2). Zusätzlich zeigen diese Moleküle meistens durch einen Aviditätseffekt eine gesteigerte apparente Affinität, die durch zwei scFv je Molekül verursacht wird. Des Weiteren können durch die Integration der konstanten Regionen neben der Steigerung der Stabilität auch Effektorfunktionen wie z. B. Neutralisierung und Aktivierung des Komplementsystems nach der Bindung der scFv-Fc-Fusionsproteine in einem Organismus folgen. Durch die gezielte Wahl des Isotyps und der Subklasse dieser konstanten Regionen können zudem bestimmte Effektorfunktionen in dem jeweiligen Organismus moduliert werden (Ward und Ghetie, 1995). Ein neu entwickeltes, rekombinantes Antikörperfragment ist das scFab, bei dem die Ketten eines Fab-Moleküls über einen 32-36 Aminosäuren langen Peptidlinker verbunden sind. Dieses Antikörperfragment wird durch Reduktion zu einer Polypeptidkette deutlich besser als das

korrespondierende Fab in *E. coli* produziert (Hust *et al.*, 2007a).

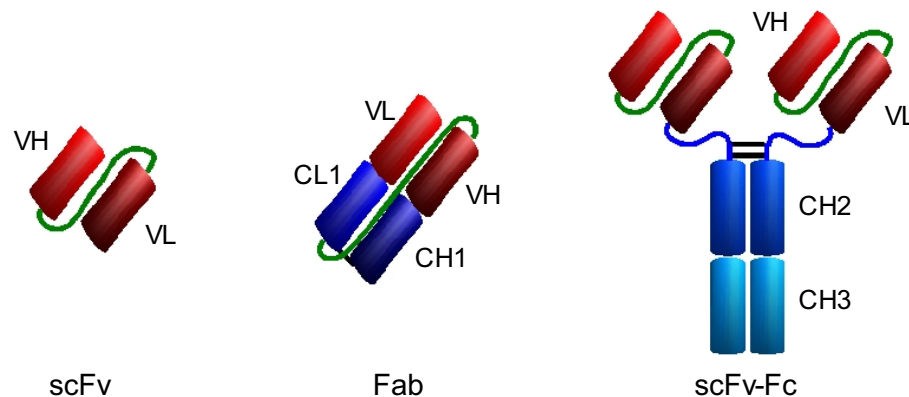


Abb. 1.2: Weitere Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften
Schematische Darstellung von Antikörperfragmenten mit den Bezeichnungen: CH1-CH3: konstante Regionen; VH: variable Region der schweren Kette; VL: variable Region der leichten Kette; CL: konstante Domäne der leichten Kette; scFv-Fc: scFv-Fc-Fusionsprotein.

1.2 Phagen-Display-Technologie

1.2.1 Der Bakteriophage M13

Viren, deren Wirtsspektrum nur Bakterien umfasst, nennt man Bakteriophagen (Phagen). Zu der Gruppe der filamentösen Phagen gehören die lysogenen Phagen M13, fd und f1, die nur Bakterienzellen infizieren, die das F-Plasmid besitzen (F⁺-Bakterien). Die auf der Bakterienoberfläche präsentierten F-Pili werden von den filamentösen Phagen zur Infektion genutzt. Die infizierte Wirtszelle reduziert ihr Wachstum nach Infektion um ungefähr 50 Prozent. Ein Partikel des Phagen M13 besitzt eine Länge von ca. 930 nm und eine Breite von ca. 6,5 nm (Abb. 1.3 A). Das ca. 6,5 kB umfassende Phagengenom liegt als zirkulärer DNA-Einzelstrang ummantelt von einer zylindrischen Proteinhülle vor (Abb. 1.3 B). Es beinhaltet insgesamt elf Gene, deren Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden können. Drei Phagenproteine (pII, pV, pX) sind für die Replikation des Phagen, drei Proteine (pI, pIV, pXI) für die Faltung der Phagenpartikel an der Bakterienmembran und fünf Phagenproteine (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX) sind für den Aufbau der Phagenhülle essentiell. Das am Kopfende fünfmal vorkommende Capsidprotein pIII bindet während der Infektion an die F-Pili der *E. coli*. Das die Phagenseite flankierende Hüllprotein pVIII besitzt die höchste Kopienzahl aller Capsidproteine mit ungefähr 2700 Molekülen je

Phage (Barbas III *et al.*, 2001; O'Brien und Aitken, 2002; Sambrook und Russell, 2001).

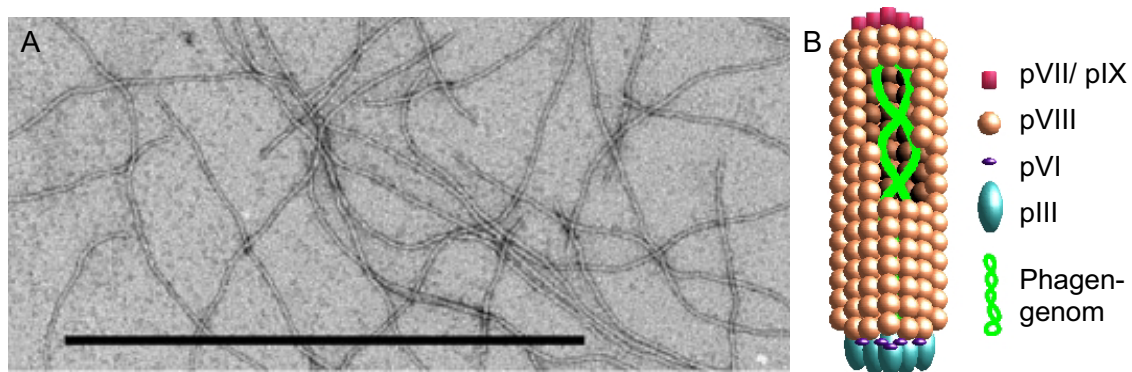


Abb. 1.3: Der Bakteriophage M13

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13-Bakteriophagen nach Negativkontrastierung, entnommen aus Wang *et al.*, 2006. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 900 nm. (B) Schematische Skizze eines Phagen M13, mit den an der Hülle beteiligten Proteinen und dem innen liegenden zirkulären Phagengenom.

1.2.2 Prinzip des Phagen-Display

Das Prinzip des Phagen-Display beruht auf einer Genotyp-gekoppelten Präsentation von Molekülen bzw. Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von M13-Phagen (Smith, 1985). Dafür werden heterogene Proteinsequenzen an Phagenproteine, die am Aufbau des Capsids beteiligt sind, fusioniert. Nach der ersten Fusion einer Restriktionsendonuklease an das Phagenprotein pIII durch Smith im Jahre 1985, etablierte sich die Verwendung von Antikörperfragmenten zur Kopplung an die Phagenproteine (Mc Cafferty *et al.*, 1990). Nach der Erprobung vieler am Capsidaufbau beteiligter Phagenproteine setzte sich das Phagenprotein pIII als Fusionspartner für scFv durch (Jespers *et al.*, 1995; Malik *et al.*, 1996) (Abb. 1.4 A). Die Größe der zum Display verwendeten Antikörperfragmente reicht heute von Formaten, die nur aus V_H bestehen, bis zum scFab (Holt *et al.*, 2003; Hust *et al.*, 2007a). Die genetische Information für diese Fusionsproteine wurde anfänglich auf einem verändertem Phagengenom kodiert, welches aber im Laufe der Zeit von Phagen-Display-Vektoren, auch Phagemide genannt, ersetzt wurde (Barbas III *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991). Auf diesen Phagen-Display-Vektoren befinden sich die genetischen Informationen für das Fusionsprotein aus Phagenprotein pIII und Antikörperfragment in einer Expressionskassette für die periplasmatische Expression in *E. coli* (Abb. 1.4 B). Meistens ist hierbei ein LacZ-Promotor sowie die Signalsequenz *pelB* (Lei *et al.*, 1987) enthalten (Hust *et al.*, 2007b; Kirsch *et al.*, 2005). Zusätzlich zu dem für die Replikation in

E. coli notwendigen Replikationsursprung ist der M13-*origin* enthalten. Dieser führt zu einzelsträngigen Kopien des Phagemids, welche anschließend anstatt des Phagengenoms in die Phagenhülle verpackt werden.

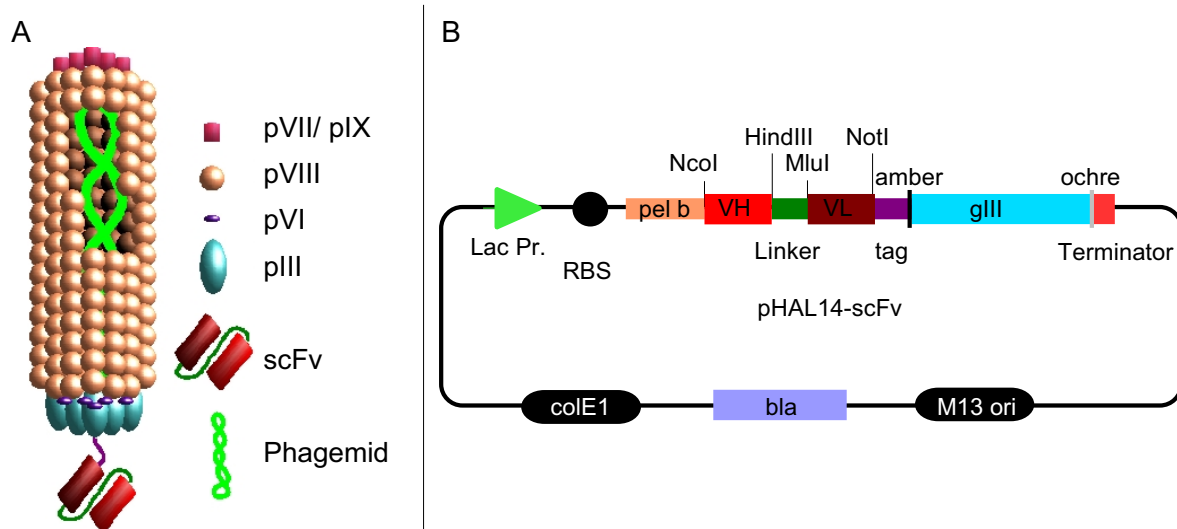


Abb. 1.4: scFv-präsentierender Phage (A) und Phagen-Display-Vektor pHAL14-scFv (B)
 (A) Schematische Darstellung eines scFv-präsentierenden Phagen. (B) Schematische Darstellung eines Phagen-Display-Vektors mit Abkürzungen: Lac Pr.: LacZ-Promotor; RBS: Ribosomale Bindestelle; pel b: Signalpeptidsequenz, VH: Gen der variablen Region der schweren Kette; Linker: Peptidlinkersequenz; VL: Gen der variablen Region der leichten Kette; tag: cDNA für (c)-Myc und His₆; amber: Amber-Stoppkodon; gIII: Gen des Phagenproteins pIII; ochre: Ochre-Stoppkodon; M13-ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*; bla: β-Laktamase-Gen; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*.

Die Entwicklung dieser Phagen-Display-Vektoren und die damit verbundene effizientere Transformation von Bakterien mit diesen Plasmiden ermöglichte den Aufbau größerer Antikörpergenbibliotheken (Barbas III *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991). Die anschließende Produktion Antikörperfragment-präsentierender Phagen erfolgt durch Superinfektion von Phagen-Display-Vektoren enthaltenden *E. coli*-Zellen mit Helferphagen, wie z. B. M13K07 (Barbas III *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991). Durch diese Superinfektion mit Helferphagen wird das zur Generierung von Antikörperfragment-präsentierenden Phagen nötige Phagengenom in die Zellen transferiert. Die entstehenden Phagenpartikel enthalten anstatt dieses Phagengenoms eine einzelsträngige Kopie des in der Zelle vorhandenen Phagemids. Die Generierung monovalent oder oligovalent Antikörperfragment-präsentierender Phagen kann durch die Verwendung verschiedener Helferphagen gesteuert werden (Soltes *et al.*, 2007). So führt der Helferphage Hyperphage aufgrund des deletierten Gens für das Phagenprotein pIII auf seinem Phagengenom zu oligovalenter Präsentation der Antikörperfragmente (Rondot *et al.*, 2001). Dagegen führt der Helferphage M13K07 zu monovalenter

Präsentation der Antikörperfragmente (Vieira und Messing, 1987). Bei der Phagen-Display-Technologie kann nun der Phage, der das gewünschte Antikörperfragment präsentiert, aus einer Mischung von Phagen, selektiert werden, die eine Vielzahl anderer Antikörperfragmente auf ihrer Oberfläche exponieren (Abb. 1.5). Diese Selektion eines spezifisch bindenden Phagen aus einer so genannten Phagenbibliothek wird als *Panning* bezeichnet (Parmley und Smith, 1988).

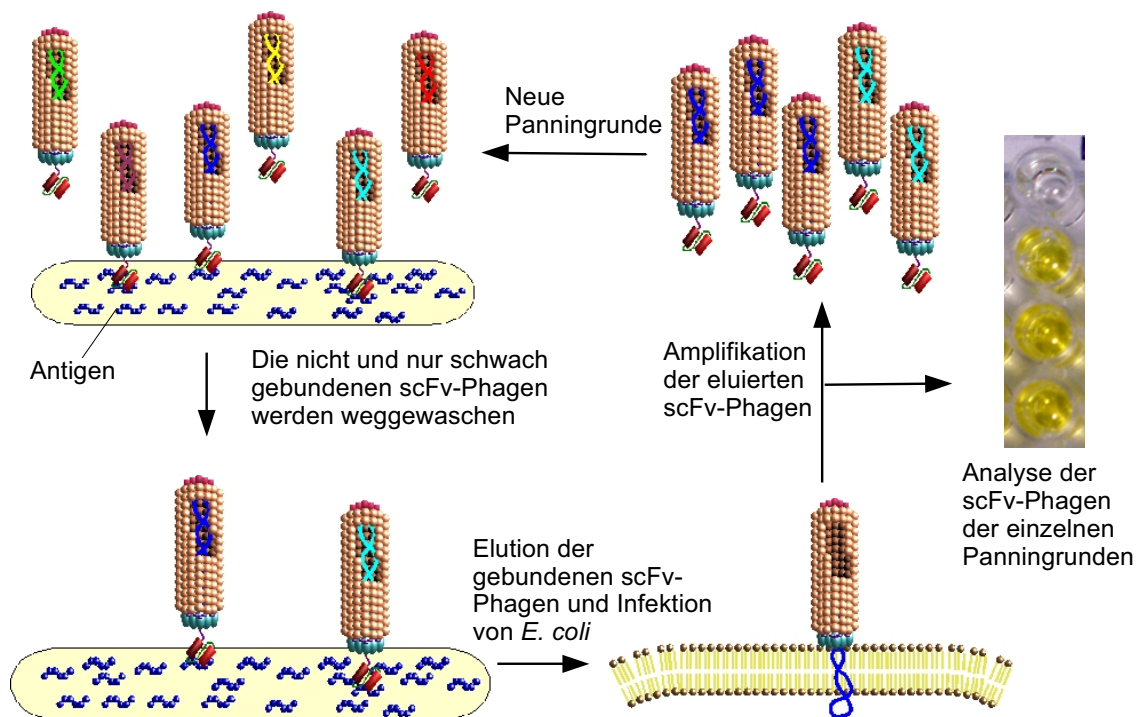


Abb. 1.5: Schematische Darstellung einer Selektion mittels Phagen-Display-Technologie scFv-Phagen: scFv-präsentierende Phagen.

Hierbei erfolgt die Bindung des Phagen an sein spezifisches Antigen, welches immobilisiert in einer Mikrotiterplatte (Barbas III *et al.*, 1991), auf magnetischen Kügelchen (Wilkinson *et al.*, 2000), in *Immunotubes* (Hust *et al.*, 2002) oder auf anderen Oberflächen vorliegt. Nachdem nicht bindende Phagenpartikel durch mehrere Waschschrte entfernt wurden, werden die Antigen-spezifischen Phagen eluiert. Im Anschluss erfolgt die erneute Amplifikation der eluierten Phagen durch Infektion von Bakterien und anschließender Superinfektion mit einem Helferphagen. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses können spezifisch bindende Phagen aus einer Mischung angereichert werden. Abschließend werden Einzelklone auf ihre Eignung, spezifische Antikörperfragmente zu produzieren, untersucht.

1.2.3 Antikörpergenbibliotheken

Eine Antikörpergenbibliothek umfasst eine Vielzahl verschiedener Antikörpergene, die bei der Verwendung der Phagen-Display-Technologie in einer Population von *E. coli* vorliegt. Die enthaltene genetische Information der Antikörperfragmente ist dabei auf Phagen-Display-Vektoren kodiert und ermöglicht somit die Verpackung mit Helferphagen zu Antikörperfragment-präsentierenden Phagen, die in eine Selektion eingesetzt werden. Für die Generierung von Antikörpergenbibliotheken wird auf die Lymphozyten nicht humaner oder humaner Spender zurückgegriffen. Je nach Spenderpopulation wird zwischen universellen und Immun-Bibliotheken unterschieden (Hust *et al.*, 2007b). Für den Aufbau einer Immunbibliothek wird die mRNA der Lymphozyten aus dem Blut immunisierter Spender isoliert. Anschließend werden die Antikörpergene aus der mRNA mit flankierenden, IgG-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und in cDNA umgeschrieben (Clackson *et al.*, 1991). Während der anschließenden Synthese von doppelsträngigen DNA-Fragmenten werden durch Oligonukleotide Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen inseriert, über welche die Antikörpergenfragmente in Phagen-Display-Vektoren integriert werden. Diese Immunbibliotheken dienen der Generierung spezifischer Antikörper gegen Antigene, mit welchen die Spender immunisiert wurden. Für universelle naive Bibliotheken sind B-Zellen nicht immunisierter Spender die Quelle. Hierbei erfolgt die Amplifikation der Antikörpergene mit IgM-spezifischen Oligonukleotiden. Aus diesen Bibliotheken können Antikörper gegen fast jedes Antigen isoliert werden (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1991). Universelle Antikörpergenbibliotheken können ebenso semi- oder komplett synthetischen Ursprungs sein. Semisynthetische Bibliotheken umfassen neben den isolierten amplifizierten Bereichen der Antikörpergene auch Regionen, in denen nicht natürliche, z. B. randomisierte Bereiche enthalten sind (Goletz *et al.*, 2002; Pini *et al.*, 1998). Aus synthetischen Bibliotheken werden Antikörperfragmente mit zufällig hergestellten CDR-Bereichen in konstanter Gerüstregion isoliert (Hayashi *et al.*, 1994; Knappik *et al.*, 2000).

1.2.4 Isolierung virusspezifischer Antikörper mittels Phagen-Display

Viele Viren eignen sich aufgrund ihrer Pathogenität nicht zur Immunisierung von Organismen. Eine der wenigen Methoden, gegen diese Pathogene Antikörper zu generieren, ist die Phagen-Display-Technologie. Selektionen unter Verwendung dieser

Methode wurden sowohl auf Basis von naiven Bibliotheken (Donà *et al.*, 2007; Rodriguez-Diaz *et al.*, 2004) als auch auf Basis von Immunbibliotheken durchgeführt (Duan *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2003). Für diese Isolierungen virusspezifischer Antikörperfragmente wurde meist auf rekombinante oder isolierte virale Proteine zurückgegriffen, da diese in reinerer Form zur Selektion eingesetzt werden können (Donà *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2005; Velappan *et al.*, 2007). Für die Isolierung spezifischer Antikörperfragmente gegen nicht umhüllte Pflanzenviren sind zwei Experimente mit kompletten Viruspartikeln und naiven Bibliotheken beschrieben worden (Griep *et al.*, 2000; Uhde *et al.*, 2000). Die einzige Selektion humaner Antikörperfragmente gegen umhüllte humanpathogene Viren mit kompletten Viruspartikeln haben Van den Brink *et al.* im Jahre 2005 beschrieben. Hierbei wurden scFv aus einer semisynthetischen humanen Antikörpergenbibliothek isoliert, die spezifisch das Coronavirus SARS erkannten. Selektionen aus Immunantikörpergenbibliotheken wurden häufiger mit kompletten Viruspartikeln durchgeführt, da Antikörperfragmente richtiger Spezifität und hoher Affinität schon in höherer Anzahl vor der Isolierung vorhanden sind (De Carvalho *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wird die Selektion humaner Antikörperfragmente aus naiven Antikörpergenbibliotheken unter Verwendung von kompletten Viruspartikeln beschrieben. Dies stellt somit eine Erweiterung der Anwendung der Phagen-Display-Technologie dar.

1.2.5 Affinitätsreifung rekombinanter Antikörperfragmente

Mehrere Methoden zur Verbesserung der Affinität rekombinanter Antikörper sind beschrieben. Die gebräuchlichste Methode ist die Einführung von Mutationen in die Gene der variablen Bereiche des Antikörperfragments. Dies kann zum einen gezielt oder aber statistisch verteilt erfolgen (Alvi *et al.*, 2003; Alzari *et al.*, 1990; Hawkins *et al.*, 1992). Bei einem gezielten Eingriff in die Sequenz der Antikörperfragmente wird häufig auf strukturelle Daten der Bindung des Antikörpers an sein Antigen zurückgegriffen. Mit diesen Methoden konnte die Affinität von scFv-Molekülen z. B. um die Faktoren 9 bis 40 gesteigert werden (Hanes *et al.*, 2000; Schier *et al.*, 1996). Zum anderen werden Austausche bestimmter Genabschnitte zur Affinitätssteigerung durchgeführt. Beim Austausch der CDR-Regionen müssen die Gene der Gerüstregionen eines Antikörperfragments eine festgelegte Sequenz beinhalten, damit diese Austausche schnell und einfach durchführbar sind (Knappik *et al.*, 2000). Ein weiterer Ansatz ist der Austausch von einer variablen Domäne im Falle eines scFv oder der Austausch einer

kompletten Kette im Falle eines Fab (*chain shuffling*) (Finlay *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2000). Mit dieser Methode konnte die Affinität eines phOx-spezifischen scFv durch den Austausch beider variabler Domänen um den Faktor 300 verbessert werden (Marks *et al.*, 1992). In den meisten Fällen wird ein Kettenaustausch bei der Humanisierung von tierischen Antikörpern durchgeführt (Hunt *et al.*, 2006; Kuepper *et al.*, 2005; Pavlinkova *et al.*, 2001). Dieses Verfahren kann aber auch zu veränderten Spezifitäten der Antigenbindung führen (Ohlin *et al.*, 1996; Ward, 1995). In vielen Fällen wurden auch verschiedene Möglichkeiten der Affinitätssteigerung miteinander kombiniert eingesetzt, um die Ausgangsmenge an modifizierten Antikörpergenen, die in die Selektion eingesetzt wurde, weiter zu erhöhen (Huls *et al.*, 2001; Luginbühl *et al.*, 2006). Da die Diversität einer Antikörpergenbibliothek zur Selektion eines optimierten Antikörperfragments kleiner als die einer naiven Antikörpergenbibliothek ist, werden hierbei neben dem Phagen-Display auch andere Display-Technologien wie z. B. das Hefe-Display verwendet (Blaise *et al.*, 2004).

1.3 Alphaviren

1.3.1 Die Biologie der Alphaviren

Alphaviren gehören der Familie *Togaviridae* an. Insgesamt umfasst die Gattung Alphavirus sechs serologische Gruppen mit insgesamt bis zu 30 Subspezies (Luers *et al.*, 2005), die einen natürlichen Übertragungszyklus zwischen Nagern und Moskitos aufweisen und deren Verbreitung geographisch begrenzt ist (Griffin, 2004). Das Genom dieser Viren ist ein (+)-RNA-Einzelstrang mit zwei offenen Leserahmen. Der eine Leserahmen kodiert vier Nichtstrukturproteine, der andere die drei Hauptstrukturproteine C, E1 und E2 sowie die Strukturproteine E3 und 6K. In einem Virion liegt der mRNA-Strang umhüllt von einem Capsid vor, welches ausschließlich aus dem ungefähr 33 kD großem C-Protein besteht. Dieses Capsid ist wiederum von einer Hüllmembran aus Lipiden umgeben, in der die beiden Proteine E1 und E2 verankert sind (Strauss und Strauss, 1994). Das ungefähr 50 kD große Glykoprotein E2 wurde als Antigen identifiziert, welches nach erfolgter Immunisierung zu neutralisierenden Antikörpern führt (Pedersen und Eddy, 1974; Kinney *et al.*, 1983). Das etwa 56 kD große Oberflächenprotein E1 wird mit der Hämagglutination roter Blutkörperchen in Verbindung gebracht (Dalrymple *et al.*, 1976). Zwischen den Arten der Gattung Alphavirus ist das

Oberflächenprotein E1 stärker konserviert als das zwischen den einzelnen Vertretern mehr variierende Oberflächenprotein E2 (Griffin, 2004; Powers *et al.*, 2001). Die beiden Glykoproteine E1 und E2 bilden membranverankerte Heterodimere, die sich wiederum zu Trimeren zusammenlagern. Von den daraus entstehenden *Spike*-Oberflächenstrukturen kommen ca. 80 je Virion vor, das einen Durchmesser von 60 bis 80 nm aufweist (Paredes *et al.*, 2001) (Abb. 1.6). Das ungefähr 10 kD große Strukturprotein E3 ist nur bei wenigen Vertretern der Alphaviren auf der Oberfläche zu finden (Strauss und Strauss, 1994), während das nur 6 kD große Strukturprotein 6K bisher noch nicht auf der Oberfläche von Alphaviren nachgewiesen werden konnte.

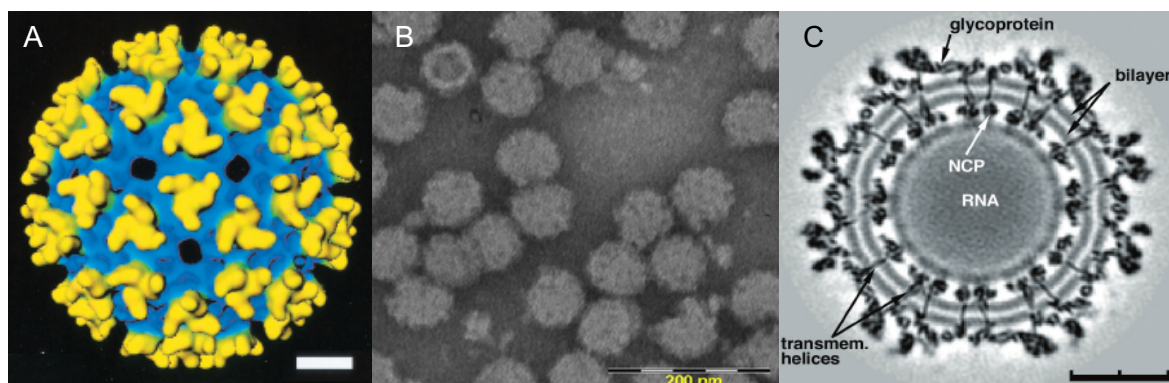


Abb. 1.6: Verschiedene Abbildungen von Alphaviren

(A) 3D-Bildrekonstruktion eines VEEV entnommen aus Paredes *et al.*, 2001. In gelb sind die spike-ähnlichen Trimere und in blau das Capsid dargestellt. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 100 Angström. (B) Transelektronenmikroskopische Aufnahme von VEEV-TC83 (Marschall, 2006 WIS). Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 200 nm. (C) Querschnitt des Sindbis-Virus bei 11 Angström mit den Bezeichnungen: NCP: C-Protein; Bilayer: Lipidmembran; Glykoprotein: E1/ E2-Dimere; Transmem. helices: Membrananker der E1/ E2-Dimere; entnommen aus Zhang *et al.*, 2002.

Einige Spezies der Alphaviren sind humanpathogen und werden als potentielle biologische Kampfstoffe eingeordnet (Hawley und Eitzen, 2001), wie die Erreger verschiedener Enzephalitiden, die Viren der Venezuelanischen, Westlichen und Östlichen Pferdeenzephalitiden, die vorwiegend in Nord- und Südamerika verbreitet sind. Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes Alphavirus ist das Chikungunyavirus (CHIKV), welches vor allem im afroasiatischen Raum auftritt. Neben diesen sind auch die bekannteren Viren Sindbis und Semliki Forest in diese Gattung eingeordnet, deren Verbreitung sich über Afrika und im Falle des Sindbis auch über Australien und Nordeuropa erstreckt. Die Viren Sindbis und Semliki Forest sind in der Regel aber nicht humanpathogen.

1.3.2 Das Venezolanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV)

Das Venezolanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) wurde im Jahre 1934 aus dem Gehirn eines Pferdes in Venezuela isoliert (Beck *et al.*, 1938). Dieses Virus zeigte andere antigene Eigenschaften als die zuvor bekannten Westliches Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV) und Östliches Pferdeenzephalitis-Virus (EEEV) (Beck *et al.*, 1938; Kubes *et al.*, 1939). Im Jahre 1943 beschrieben Casals *et al.* erstmals die VEEV-Infektion eines Menschen. Es handelte sich um einen Labormitarbeiter, der mit der Isolation von VEEV-verwandten Stämmen betraut war (Casals *et al.*, 1943). Bis heute hat das VEEV mehrfach humane Epidemien ausgelöst, in den 90er Jahren u. a. in Peru und Mexiko (Powers *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1984; Weaver *et al.*, 1996). Die Beschwerden, die VEEV nach Infektion eines Menschen auslöst, können von leichtem Fieber bis hin zu tödlichen Enzephalitiden reichen, deren Sterblichkeit bei lokalen Ausbrüchen zwischen 4 und 35 Prozent lag (Leitenberg, 2001). Aufgrund der möglichen Übertragung auf den Menschen und der schwerwiegenden Krankheitssymptome ist VEEV als bioterroristisches Agens der Kategorie B, d. h. mit zweithöchster Risikopriorität, klassifiziert. Zudem kann dieses gegen Umwelteinflüsse relativ stabile Virus in großen Mengen produziert werden und ist als Aerosol hoch infektiös (Blue Book, 2005; Reed *et al.*, 2004).

Insgesamt werden Viren des serologischen VEE-Komplex in sechs Subtypen unterteilt. Nur für Virusstämme des Subtyps 1 sind Wirtswechsel zum Menschen mit einhergehenden schwerwiegenden Erkrankungen beschrieben (Griffin, 2004). Von einem dieser Stämme, dem Trinidad-Esel-Virusstamm, wurde ein attenuierter Stamm durch Passagieren in einer Meerschweinchenzelllinie hergestellt (Berge *et al.*, 1961). Dieser Stamm, VEEV-TC83, wird jedoch nicht zur breiten Immunisierung der Bevölkerung verwendet, da bei einer Impfung schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten können (Berge *et al.*, 1961; Philippotts *et al.*, 2002). Im Vergleich zum Wildtypstamm weist VEEV-TC83 zwölf Basenaustausche innerhalb des RNA-Einzelstrangs auf, die sowohl in dem 5'-endständigen, nicht kodierenden Bereich als auch im Bereich, der die genetische Information für die Oberflächenproteine E1 und E2 enthält, liegen. Diese Mutationen führen zu fünf Aminosäureaustauschen im Glykoprotein E2 und einem im Glykoprotein E1 (Kinney *et al.*, 1993).

1.3.3 Historie der Generierung von Antikörpern gegen VEEV

Monospezifische und hochaffine Antikörper gegen die Vertreter der Gattung Alphavirus sind für die schnelle Diagnostik, Typisierung und eventuelle Therapie bisher nur limitiert verfügbar. Aufgrund der Pathogenität der Wildstämme wurde eine Immunisierung mit Alphaviren erst durch die Einführung des attenuierten VEEV-Stammes TC83 möglich (Berge *et al.*, 1961, Kinney *et al.*, 1993). Die Immunität gegen VEEV entwickelt sich nach Vakzinierung mit diesem Impfstamm schnell, nach vier Tagen waren Mäuse bereits gegen die Infektion von VEEV geschützt und neutralisierende Antikörper nachweisbar (Burke *et al.*, 1977; Ferguson *et al.*, 1978). Die ersten gegen VEEV generierten monoklonalen Antikörper beruhen auf der Hybridomatechnologie nach der erfolgten Immunisierung von Mäusen mit VEEV-TC83 (Roehrig *et al.*, 1980). Mithilfe dieser teilweise neutralisierenden Antikörper konnten für die Infektion wichtige Bereiche des Oberflächenproteins E2 identifiziert werden (Mathews und Roehrig, 1982; Roehrig *et al.*, 1982, 1985). Einige murine Antikörper gegen dieses Virus konnten auch durch Immunisierung mit dem Semliki Forest-Virus der Gattung Alphavirus erhalten werden (Greiser-Wilke *et al.*, 1991). Die generierten Antikörper zeigten eine breite Kreuzreaktivität und erkannten auch VEEV. Mit diesen E1-spezifischen und weiteren Antikörpern wurde ein Sandwich-ELISA zur Detektion von Alphaviren aufgebaut (Greiser-Wilke *et al.*, 1991). Die ersten rekombinanten Antikörper wurden aus den von Roehrig *et al.* (1982) generierten Hybridomzelllinien durch Isolierung der cDNA VEEV-spezifischer muriner Antikörper gewonnen (Alvi *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2002, 2003, 2004). Da der Impfstamm VEEV-TC83 zur Immunisierung der breiten Bevölkerung nicht eingesetzt wird, müssen Antikörper zum potentiellen Einsatz für eine humane Therapie anders gewonnen werden. Ein von Roehrig generierter, muriner, VEEV-neutralisierender Antikörper wurde im Jahre 2006 erstmals durch einen Austausch beider Ketten durch humane Äquivalente erfolgreich humanisiert (Hunt *et al.*, 2006). Humane Antikörperfragmente gegen VEEV wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals direkt aus naiven Antikörpergenbibliotheken isoliert.

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten rekombinante Antikörperfragmente aus universellen, humanen Antikörpergenbibliotheken gegen das humanpathogene Venezuelanische

Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) isoliert und charakterisiert werden. Für die Antikörperselektion sollten intakte Viruspartikel des Stammes VEEV-TC83 verwendet werden. Die generierten Antikörperfragmente sollten durch Test auf verschiedenen VEEV-Präparationen und durch Bestimmung ihrer Kreuzreaktionen innerhalb der Gattung Alphavirus charakterisiert werden.

Eines der VEEV-spezifischen Antikörperfragmente sollte durch Austausch der V_L -Kette (*chain shuffling*) hinsichtlich seiner VEEV-Bindungseigenschaften verbessert werden.

Zur weiteren Charakterisierung VEEV-spezifischer Antikörper sollte eine Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D unter Verwendung von Viruspartikeln etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--------------------------------|---|
| CM3-Chip | GE Healthcare, München |
| Elektroporationsküvette | BioRad, München |
| Dialyseschlauch | Servapor, Serva, Heidelberg |
| Filterpapier | GB 002, Schleicher-Schüll, Eschborn |
| Magnetische Epoxy-Partikel | M270 Dynal-Partikel, Invitrogen, Karlsruhe |
| Mikro-Schraubröhrchen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Mikrotiterplatte | Maxisorp, Nunc, Wiesbaden Falcon, BD, Heidelberg |
| PCR-Reaktionsgefäß | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Petrischale | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Polypropylen-Platte/ -Röhrchen | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| PVDF-Membran | Carl Roth, Karlsruhe |
| Reaktionsgefäß, 1,5/ 2 mL | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturplatte | Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Zellkulturschale | Sarstedt, Nümbrecht |

2.1.2 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

| Gerät | Typ | Hersteller |
|----------------------|--|--|
| Blot-Apparatur | TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell | BioRad, München |
| Elektrophoresekammer | Miniprotean 3 cell | BioRad, München |
| Elektroporator | Micro Pulser | BioRad, München |
| ELISA-Reader | Tecan Sunrise, | Tecan, Crailsheim |
| ELISA-Washer | Columbus Plus | Tecan, Crailsheim |
| Filtriereinheit | Nalge Celluloseacetat- Filter 0,2 µm und 0,45 µm | Nunc, Wiesbaden Sartorius AG, Göttingen |

Tab.2.1 (Fortsetzung): Verwendete Geräte

| Gerät | Typ | Hersteller |
|--|--|---|
| Geldokumentation | Gel Jet Imager | Intas, Göttingen |
| Heizblock | Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Inkubator | Typ BE 400 | Memmert, Schwabach |
| Lichtmikroskope | Diavert CK2 | Leica, Solms Olympus |
| Magnetpartikelseparator | MPCS-Dynal | Invitrogen, Karlsruhe |
| Netzgeräte | EPS 301/601 Power Supply-EPS 301 | GE Healthcare, München |
| Chromatographische Anlage zur Proteinreinigung | Äkta prime 1mL Protein A Säule | GE Healthcare, München |
| Reinstwasser-Anlage | Arium 611 | Sartorius AG, Göttingen |
| Schüttelinkubatoren | BS 4 B HT Thermo Shaker PST-60H-4 | B.Braun, Melsungen HT Infors AG, Basel Lab4you, Berlin |
| DNA-Sequenziergerät | ABI Prism 310 Genetic Analyzer P.E. Applied Biosystems | Perkin-Elmer, Waltham, USA |
| Spektrophotometer | Ultrospec II Pharmacia LKB ND1000 | GE Healthcare, München NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |
| Sterilwerkbänke | LaminAir HLB 2472 Herasafe | Heraeus, Hanau Kendro, Berlin |
| Oberflächenplasmon- resonanz-Messgerät | Biacore2000 | GE Healthcare, München |
| Thermocycler | DNAEngine PTC-150 MinicyclerTM | BioRad, München MJ Research, Waltham, USA |
| Überkopfschüttler | Rotator | Gkisker, Steinfurt |
| Waage | 1205 MP | Sartorius AG, Göttingen |
| Zentrifugen | 5415D/ 5810R Biofuge pico Sorvall RC5/ RC5B Plus | Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Kendro, Berlin |

2.1.3 Chemikalien

Wenn im Text nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Fluka/ Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Sarstedt), Roche (Mannheim) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Für die Puffer und Lösungen sowie in allen Experimenten wurde Wasser aus der Reinstwasser-Anlage verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Komponenten in diesem Wasser gelöst bzw. verdünnt.

| | |
|---|--|
| Acrylamidmix | 30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid |
| AEC-Lösung | 2 mg AEC 300 µl Dimethylformamid 5 mL 0,5 M Natriumacetat-Puffer; pH 5 2,5 µl H ₂ O ₂ |
| BCIP-Lösung | 15 mg/mL BCIP in Dimethylformamid |
| Bindepuffer bei Proteinreinigung über Protein A | 20 mM Natriumphosphat; pH 7 |
| Boratpuffer | 100 mM Natriumborat; pH 8,5 |
| Carbonatpuffer | 50 mM Natriumcarbonat; pH 9,6 |
| CTAB-Lösung | 5 % (w/v) CTAB 200 mM NaCl |
| Coomassie-Färber | 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,5 % (w/v) Coomassie Blau G-250 |
| Coomassie-Entfärber | 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure |
| Elutionspuffer bei Proteinreinigung über Protein A | 0,1 M Citratpuffer; pH 2,5 |
| Entwickler bei Silberfärbung | 3 g Dinatriumcarbonat 25 µL 37 % (v/v) Formaldehyd 1 mL Natriumthiosulfatlösung in 50 mL |
| Ethidiumbromidlösung | 10 mg/mL Ethidiumbromid |
| Fixierer für Silberfärbung | 50 mL Stopplösung für Silberfärbung 25 µL 37 % Formaldehyd |
| Glycinpuffer | 0,1 M Glycinpuffer; pH 2,2 |
| HEPES-Puffer | 10 mM HEPES; pH 7,4 0,15 M NaCl 3 mM EDTA 0,005 % (v/v) Detergenz P20 (Peroxid frei) |
| IPTG-Lösung | 1 M IPTG |
| Laemmli-Puffer fünffach konzentriert (red./ nicht-red.) | 3,6 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau (bei red. 15 % (v/v) β-Mercaptoethanol) |
| MPBST | Milchpulver gelöst in PBST |

| | |
|---|--|
| NBT-Lösung | 30 mg/mL NBT in 70 % (v/v) Dimethylformamid |
| Natriumacetatlösung | 3 M Natriumacetat; pH 5,2 |
| Natriumthiosulfatlösung | 10 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 50 mL |
| Neutralisationspuffer bei Selektionen | 0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,6 |
| Neutralisationspuffer bei Proteinreinigung mit Protein A | 2 M Tris; pH 9,0 |
| PBS | 8 g/L NaCl 0,2 g/L KCl 1,44 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g/L KH_2PO_4 pH 7,4 |
| PBST | 0,05 bis 0,1 % (v/v) Tween20 in PBS |
| PBST (für Biacore) | 0,005 % (v/v) Tween20 (Peroxid frei) in PBS |
| PEG/ NaCl-Lösung | 20 % (w/v) PEG 6000 2,5 M NaCl |
| Phagenverdünnungspuffer | 10 mM Tris; pH 7,5 20 mM NaCl 2 mM EDTA |
| Plasmid-Präparationspuffer P1 | 50 mM Tris/HCl; pH 8 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A (frisch dazugeben) |
| Plasmid-Präparationspuffer P2 | 0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS |
| Plasmid-Präparationspuffer P3 | 3 M Kaliumacetat; pH 5,5 |
| SDS-PAGE-Laufpuffer | 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS |
| Silberlösung | 0,5 mL 20 % (w/v) Silbernitrat 37,5 µL 37 % (v/v) Formaldehyd in 50 mL |
| Stopplösung bei Silberfärbung | 50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Eisessig |
| Stopplösung bei ELISA | 1 N H_2SO_4 |
| Substratpuffer | 100 mM Tris; pH 9,5 0,5 mM MgCl_2 |
| TAE-Puffer 50-fach konzentriert | 2 M Tris 1 M Essigsäure pH 8,0 |
| TMB Lösung A | 30 mmol/L Kaliumcitrat 1 % (w/v) Zitronensäure; pH 4,1 |
| TMB Lösung B | 10 mmol/L Tetramethylbenzidin 10 % (v/v) Aceton 90 % (v/v) Ethanol 80 mmol/L H_2O_2 (30 %) Lösung A wurde 21:1 mit Lösung B vermischt. |

| | |
|---|---|
| Transferpuffer bei Westernblot | 0,025 M Tris/HCl 0,192 M Glycin 10 % (v/v) Methanol |
| Trypsin-Lösung | 10 µg/mL Trypsin in PBS |
| Waschpuffer bei Proteinreinigung mit Protein A | 0,1 M Citratpuffer; pH 5 |

2.1.5 Nährmedien und Supplemente

2.1.5.1 Prokaryotische Kultivierung

Für die Medien und Supplemente wurde Wasser aus der Reinstwasser-Anlage verwendet. Die Lösungen wurden autoklaviert, bevor sterilfiltrierte Antibiotika oder Supplementlösungen zugefügt wurden.

| | |
|--------------------------|---|
| 2xTY-Flüssigmedium | 1,6 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,0 |
| 2xTY-Agar | 1,5 % (w/v) Agar in 2xTY-Medium |
| 2xTY-AK-Medium | 100 µg/mL Ampicillin in 2xTY-Medium 50 µg/mL Kanamycin |
| 2xTY-GA-Medium | 0,1 Mol/L Glukose in 2xTY-Medium 100 µg/mL Ampicillin |
| 2xTY-T-Medium | 50 µg/mL Tetracyclin in 2xTY-Medium |
| SOC-Medium | 2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl pH 7,0 Nach dem Autoklavieren zugeben: 20 mM Mg ²⁺ -Lösung 20 mM Glukose |
| Mg ²⁺ -Lösung | 1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄ |
| Glukoselösung | 2 M Glukose |
| Ampicillinlösung | 100 mg/mL Ampicillin |
| Kanamycinlösung | 10 mg/mL Kanamycin |
| Tetracyclinlösung | 5 mg/mL Tetracyclin in Ethanol |

2.1.5.2 Eukaryotische Kultivierung

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| DMEM-Medium (<i>High Glucose</i>) | PAA Lab, Parsing, Österreich |
| 4,5 g/L Glukose | |
| 2 mM L-Glutamin | |
| 1,5 g/L Natriumbicarbonat | |
| Fötale Kälberserum (FCS) | PAA Lab, Parsing, Österreich |
| Fötale Kälberserum Low IgG | PAA Lab, Parsing, Österreich |
| Penicillin/Streptomycin | PAA Lab, Parsing, Österreich |
| Trypsin/EDTA | PAA Lab, Parsing, Österreich |

2.1.6 Bakterienstämme und Bakteriophagen

| | |
|------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue-MRF' | Stratagene; K12 strain: $\Delta(\text{mcrA})183$ $\Delta(\text{mcrCBhsdSMR-mrr})173 \text{ endA1}$ $\text{supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)] |
| Helferphage Hyperphage | Progen Biotechnik, Heidelberg (Rondot <i>et al.</i> , 2001) |
| Helferphage M13K07 | GE Healthcare, München (Vieira und Messing, 1987) |

2.1.7 Zelllinien und Virusstämme

| | |
|-------------|--|
| BHK-21 | Nierenzelllinie des syrischen Hamsters, WIS; DSMZ-ACC 61 |
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzelllinie, AG Dübel, TU Braunschweig; DSMZ-ACC 305 |
| Vero-B4 | Nierenzelllinie des afrikan. Grünaffen, WIS; DSMZ-ACC 33 |
| CHIKV | NCPV#636 Stamm S27 Petersfield, WIS |
| EEEV | NCPV#598 Stamm H178/99, WIS |
| VEEV-TC83 | Attenuierter VEEV-Trinidad-Esel-Stamm, WIS |
| VEEV-H12/93 | NCPV#599 Stamm H12/93 aus UK, WIS |
| VEEV-230 | Attenuierter VEEV-Stamm 230, Russland, (Frolov <i>et al.</i> , 1991), WIS |
| WEEV | NCPV#602 Stamm H160/99, WIS |

2.1.8 Plasmide

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

| Name | Beschreibung | Verwendungszweck |
|------------------|---|---|
| pSEX81 | Phagen-Display-Vektor der Antikörpergenbibliothek Heidelberg | Phagen-Display, Expression von scFv-pIII-Fusionsproteinen |
| pIT2 | Phagen-Display-Vektor der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) | Phagen-Display, Expression von scFv |
| pHAL14 | Phagen-Display-Vektor der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 | Phagen-Display, Expression von scFv |
| pCMV-hlgG1-Fc-XP | Eukaryotischer Expressionsvektor für scFv-Fc-Fusionsproteine | Expression von scFv-Fc-Fusionsproteinen |

Die Vektorkarten der verwendeten Plasmide sind im Anhang hinterlegt.

2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Biomers.net (Ulm) synthetisiert.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz (5'-3') | Funktion |
|---------------------|--|---|
| MHgIII_r1 | cta aag ttt tgt cgt ctt tcc | Vervielfältigung des scFv-Gens in pHAL14, pIT2 und pSEX81; Sequenzierung in pIT2 und pSEX81 |
| MHLacZPro_f | ggc tcg tat gtt gtg tgg | Vervielfältigung des scFv-Gens in pHAL14, pIT2 und pSEX81; Sequenzierung in pIT2 und pSEX81 |
| MK-myc_r | gat cct ctt ctg aga tga g | Vervielfältigung oder Sequenzierung des scFv-Gens in pHAL14 |
| MK-pelb_f | gcc tac ggc agc cgc tgg | Vervielfältigung oder Sequenzierung des scFv-Gens in pHAL14 |
| MH-yolNotI_r | gat gag cgg ccg cta ctc act tat acg cgt gct tct gaa aat tc | Vervielfältigung des V _H -Gens in pSEX81 |
| pCMV-hlgG1-Fc_f | cgc aaa tgg gcg gta ggc | Vervielfältigung oder Sequenzierung des scFv-Gens in pCMV-hlgG1-Fc-XP |
| pCMV-hlgG1-Fc_r | cca gga gtt cag gtg ctg | Vervielfältigung oder Sequenzierung des scFv-Gens in pCMV-hlgG1-Fc-XP |
| ToR-mlgG01-FC-seq-f | cac ttt gcc ttt ctc tcc | Sequenzierung des scFv-Gens in pCMV-hlgG1-Fc-XP |

2.1.10 Enzyme

| | |
|---------------------------|---|
| DNA-Ligase | T4-DNA-Ligase, Promega, Mannheim |
| DNA-Phosphatase | CIP, NEB, Frankfurt am Main |
| Restriktionsendonukleasen | MBI Fermentas, St. Leon-Rot NEB, Frankfurt am Main |
| Taq-Polymerase | RedTaq, Sigma, München |
| Trypsin | Sigma, München |

2.1.11 Antikörper

| | |
|------------------------------------|--|
| HERCEPTIN | mAk, Roche, Penzberg |
| Human Anti-Mucin1, IIB6 | monoklonales scFv, AG Dübel, TU Braunschweig |
| Human Anti-Lysozym, D1.3 | monoklonales scFv, AG Dübel, TU Braunschweig |
| Maus Anti-(c)myc, 9E10 | mAk, AG Dübel, TU Braunschweig |
| Maus Anti-M13-POD | mAk, GE Healthcare; München |
| Maus Anti-pIII | mAk, Mobitec, Berlin |
| Maus Anti-Profilin2 | mAk, AG Illenberger, TU Braunschweig |
| Maus WIS-mAk 8/6 (Anti-VEEV-E2) | mAk, WIS |
| Maus WIS-mAk 8747 (Anti-VEEV-E2) | mAk, WIS |
| Maus WIS-mAk VEEWIS1 (Anti-VEEV) | mAk, WIS |
| Maus WIS-mAk 4G2 (Anti-Flavivirus) | mAk, WIS |
| Protein N | pAk, Dade Behring, Eschborn |
| Ziege Anti-Human-IgG-Fc | pAk, Sigma, München |
| Ziege Anti-Human-IgG-Fc-AP | pAk, Dianova, München |
| Ziege Anti-Human-IgG-γ-Kette-POD | pAk, Sigma, München |
| Ziege Anti-Maus-IgG-Fc-AP | pAk, Sigma, München |
| Ziege Anti-Maus-IgG-Fc-POD | pAk, Sigma, München |
| Ziege Anti-Maus-IgG-Fab-POD | pAk, Sigma, München |

2.1.12 Kit-Systeme

| | |
|--|---------------------------------------|
| <i>Big Dye Terminator Sequencing Kit</i> | P.E. Applied Biosystems, Waltham, USA |
| <i>GFX Micro Plasmid Prep Kit</i> | GE Healthcare, München |

| | |
|--|---|
| GFX <i>pCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> | GE Healthcare, München |
| HEKfectin | BioRad, München |
| Qiagen Plasmid Midi Kit (100) | Qiagen, Hildesheim |
| Virus Recovery System (VRS) | Matrex Cellufine Sulfate Medium Chisso Corp. Japan |

2.1.13 Computerprogramme und Datenbanken

| | |
|------------------|--|
| Finch TV 1.3.1 | Darstellung und Auswertung von Sequenzdaten, Geospiza Inc., Seattle, USA. |
| Vector NTI | Darstellung von Plasmiden, Planung Klonierungen, InforMax Inc., USA. |
| NCBI-Datenbank | <i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA |
| SigmaPlot | Statistikprogramm, Systat |
| VBASE2-Datenbank | Analyse von Antikörpersequenzen; (Retter <i>et al.</i> , 2005) |

2.1.14 Sonstiges

| | |
|---|---|
| Bradford-Reagenz (fünffach konzentriert) | BioRad, München |
| DNA-Massenstandard | Generuler™ 50bp DNA Ladder MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| dNTPs | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Gelladepuffer (sechsfach) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Injektionslösung für Sequenzierung | Millipore, Eschborn |
| Protein-Massenstandard | Precision Plus Protein Standard BioRad, München |
| Streptavidin-POD | GE Healthcare, München |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde eine PCR (polymerase chain reaction) mit die Zielregion flankierenden Oligonukleotiden durchgeführt. Eine PCR wurde mit den in der Tab. 2.4 gelisteten Substanzen und mit dem in Tab. 2.5 dargestellten Temperaturverlauf durchgeführt. Als Grundlage wurde dem PCR-Ansatz entweder isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien zugefügt.

Tab. 2.4: Ansatz einer PCR

| Komponente | Menge |
|--------------------------|----------|
| dNTPs (je 10 mM) | 0,4 µL |
| 10x Puffer RedTaq | 2 µL |
| Oligonukleotid_f (10 µM) | 0,2 µL |
| Oligonukleotid_r (10 µM) | 0,2 µL |
| RedTaq-Polymerase | 0,5 µL |
| template DNA (10-100 ng) | 0-0,5 µL |
| Wasser | ad 20 µL |

Tab. 2.5: Temperaturverlauf einer PCR

| Zyklenanzahl | Temperatur | Inkubationszeit |
|--------------|------------|-----------------|
| 1 | 94 °C | 60 s |
| 25-30 | 94 °C | 30 s |
| | 56 – 64 °C | 30 s |
| | 72 °C | 30-90 s |
| 1 | 72 °C | 600 s |

Hierbei richtete sich die *Annealing*-Temperatur nach der Zusammensetzung der Oligonukleotide und die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

2.2.2 Gelelektrophoretischer DNA-Nachweis

DNA wurde zum Nachweis in einem Agarosegel der Größe und Form nach elektrophoretisch getrennt und durch interkalierendes Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hierzu wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente Gele mit 1-2 % (w/v) Agarose hergestellt. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese, falls erforderlich, mit sechsfachem Gelladepuffer versetzt. Die Trennung der DNA-Fragmente wurde 30 min bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht mittels der Geldokumentationsapparatur.

2.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Purification Kit

DNA-Fragmente wurden aus Lösungen oder aus Agarosegelen mit dem *GFX DNA and Gel Band Purification Kit* gereinigt. Das *Kit* wurde gemäß den Angaben des Herstellers angewandt. Die DNA-Fragmente wurden mit 20-50 µL Wasser eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der eluierten DNA photometrisch bestimmt.

2.2.4 Präzipitation von DNA-Fragmenten

Zur Reinigung von DNA-Molekülen aus einer Lösung wurde eine Salz-Ethanolfällung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µL Natriumacetatlösung und 250 µL reines Ethanol zugegeben. Danach folgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation für 5 min bei 15400 xg und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das DNA-Pellet wurde ein- bis zweimal mit 250 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 2 min bei 15400 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets bei 37 °C wurde die DNA in 10-30 µL Wasser resuspendiert.

2.2.5 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte über die Absorption der DNA-Lösung bei der Wellenlänge von 260 nm. Die Absorption einer doppelsträngigen DNA von eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter. Zur Reinheitskontrolle wurde die Absorption der DNA-Lösung auch bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm durch die bei 280 nm beträgt bei einer reinen DNA-Lösung 1,8.

2.2.6 Enzymatische Restriktion von DNA

Zur Gewinnung definierter DNA-Fragmente wurde doppelsträngige DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typs II geschnitten. Eine Restriktion wurde in 30 µL durchgeführt und enthielt die folgenden Komponenten:

Tab. 2.6: Ansatz einer DNA-Restriktion

| Komponente | Volumen | Menge |
|---|----------|----------|
| 10x Puffer | 3 µL | 1x |
| Restriktionsenzyme (max. 3 verschiedene) | 1-4 µL | 10-40 U |
| DNA | ad 30 µL | ca. 1 µg |

Eine DNA-Restriktion erfolgte für drei Stunden bis über Nacht bei dem jeweiligen Temperaturoptimum der verwendeten Restriktionsendonuklease. Abschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Danach folgte entweder die Dephosphorylierung oder die Reinigung der DNA.

2.2.7 Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen

Zur Dephosphorylierung endständiger 5'-Phosphatgruppen linearisierter DNA wurde das Enzym CIP verwendet. Dem jeweiligen Restriktionsansatz wurden zweimal 0,5 µL DNA-Phosphatase hinzugegeben, bevor der Ansatz jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach der Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65 °C wurde die DNA für eine Elektrophorese verwendet oder mittels *Purification Kit* oder Salz-Ethanol-fällung gereinigt.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation von DNA-Fragmente mittels T4-DNA-Ligase wurde jeweils ein molares Verhältnis zwischen Vektor- und dem zu inserierenden DNA-Molekül von 1:3 eingesetzt. Eine Ligation wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und war wie folgt zusammengesetzt:

Tab. 2.7: Ansatz einer Ligation

| Komponente | Erstellung eines Konstrukts | | Bibliothekserstellung | |
|------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------|
| | Volumen | Menge | Volumen | Menge |
| 10x Puffer | 1 µL | 1x | 10 µL | 1x |
| T4-Ligase | 0,5 µL | 1,5 U | 1 µL | 3 U |
| Vektor | 1-2 µL | ca. 50 ng | 5 µL | 1000 ng |
| Insert | 4-7 µL | 3:1 molar zu Vektor | 8 µL | 250 ng (3:1 molar zu Vektor) |
| Wasser | ad 10 µL | | ad 100 µL | |

Nur für eine anschließende Elektroporation wurden die Ligationsansätze mittels Präzipitation gereinigt, sonst wurden sie direkt für die Transformation von *E. coli XL1-Blue*-Zellen verwendet.

2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA mittels Kit

Für die Minipräparation wurde das *GFX Micro Plasmid Prep Kit* verwendet. Die Midipräparation wurden mit dem *Qiagen Plasmid Midi Kit* durchgeführt. Die Durchführung erfolgte jeweils gemäß den Angaben der Hersteller. Nach der Elution der isolierten Plasmid-DNA in 50 µL bzw. 200 µL Wasser wurde diese bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA mit anschließender CTAB-Fällung

Es wurde eine 5 mL Übernachtskultur plasmidenthaltender *E. coli XL1-Blue*-Zellen in 2xTY-GA-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 3220 xg und 4 °C gewonnene Zellpellet in 400 µL eiskaltem Plasmid-Präparationspuffer P1 resuspendiert. Es wurden 400 µL des Plasmidpräparationspuffer P2 zugefügt und fünfmal invertiert. Nach max. 5 min folgte die Zugabe von 400 µL Plasmid-Präparationspuffer P3. Nach fünfmal Invertieren wurde der Ansatz 15-20 min auf Eis inkubiert. Nach zweimal 10-minütiger Zentrifugation bei 15400 xg und 4 °C wurden zu 600 µL des klaren Überstand 31 µL CTAB-Lösung zugefügt. Nach 20 min bei RT und 20 min auf Eis folgte eine Zentrifugation für 45 min bei 15400 xg und 4 °C. Das durchsichtige Pellet wurde in 500 µL 1,2 M NaCl für 15-30 min bei RT gelöst und mittels Salz-Ethanol-fällung gereinigt.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit einem modifizierten Kettenabbruchverfahren nach Sanger. Eine PCR wurde mit den in Tab. 2.8 gelisteten Substanzen und mit dem in Tab. 2.9 dargestellten PCR-Programm durchgeführt.

Tab. 2.8: Ansatz einer DNA-Sequenzierung

| Komponente | Volumen |
|---|----------|
| DNA (Plasmid 300 ng; PCR-Produkt 25 ng) | 1-3 µL |
| Oligonukleotid [10 µM] | 1 µL |
| Big Dye (Enzym, Puffer, ddNTPs, dNTPs) | 1-1,5 µL |
| Terminator-Puffer (5x) | 2 µL |
| Wasser | ad 10 µL |

Tab. 2.9: Sequenzierungs-PCR

| Zyklen | Temperatur | Zeit |
|--------|------------|-------|
| 1x | 94 °C | 60 s |
| 24x | 94 °C | 30 s |
| | 56 °C | 15 s |
| | 70 °C | 240 s |

Nach der PCR wurde die DNA mittels Salz-Ethanol-fällung gereinigt und in 15 µL Injektionslösung aufgenommen. Nach der Denaturierung der Probe für 2 min bei 90 °C wurde die Sequenz mit dem Sequenziergerät ABI 310 analysiert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Anlegen von Glycerinstocks

Um Bakterienkulturen dauerhaft aufzubewahren, wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden 800 µL Bakterienkultur mit 200 µL ca. 90 % Glycerin in einem 2 mL Reaktionsgefäß vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Es wurden 50 mL 2xTY-T-Medium mit *E. coli* XL1-Blue-Zellen bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Das Volumen wurde in zwei Polypropylen-Röhrchen überführt und die Zellen 10 min bei 4 °C und 3220 xg sedimentiert. Danach wurden die Zellpellets in je 7,5 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nachdem die Zellen für 10 min bei 4 °C und 3220 xg nochmals sedimentiert worden waren, wurde jedes Zellpellet in 1 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 1 h auf Eis wurde jeweils 1 mL einer eiskalten 40 % (v/v) Glycerinlösung in 100 mM CaCl₂ zugefügt. Die Lösung wurde jeweils in 150 µL Aliquots aufgeteilt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Der komplette Ligationsansatz wurde zu 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen auf Eis zugefügt. Nach 20 min auf Eis wurde die Zellsuspension für 1 min auf 42 °C erwärmt und danach für 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 mL auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 250 rpm

inkubiert. Die Bakterienzellen wurden auf 2xTY-GA-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.4 Elektroporation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Elektroporation wurden die bei -80 °C gelagerten elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen auf Eis aufgetaut. Danach wurde der komplette Ligationsansatz zu 25 µL Bakterien zugefügt, bevor die Zellsuspension in eine vorgekühlte Küvette (Elektrodenabstand 1 mm) überführt wurde. Nach der Elektroporation mit einem Puls von 1,8 kV wurde zu dem Ansatz 1 mL 37 °C warmes SOC-Medium hinzugegeben. Nach 1 h bei 37 °C und 250 rpm wurden die Zellen für 2 min bei 15400 xg abzentrifugiert und komplett auf 2xTY-GA-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.5 Selektion von scFv-präsentierenden Phagen aus Antikörpergenbibliotheken

2.3.5.1 Selektion mit den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson (I+J)

Zur Selektion wurde VEEV-TC83 aus Zellkulturüberstand mittels des *Virus Recovery System* (VRS) und eines Cäsiumchloridgradienten gereinigt und konzentriert. Eine 1:1 Mischung von VEEV-TC83 aus Verozellen ($4 \cdot 10^9$ KID₅₀/mL) und VEEV-TC83 aus BHK-Zellen ($2 \cdot 10^{11}$ KID₅₀/mL) wurde für die Selektion verwendet. Zur Immobilisierung wurden jeweils 150 µL Viruslösung in zwei Kavitäten einer Nunc Maxisorb Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 2 % (w/v) MPBST gefüllt und für 1h bei RT inkubiert. Zeitgleich wurden die mit dem Helferphagen Hyperphage verpackten Phagen der beiden Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson in 150 µL 2 % (w/v) MPBST präinkubiert. Es wurden $1,4 \cdot 10^{10}$ cfu scFv-präsentierende der Antikörperbibliothek Heidelberg und $3,8 \cdot 10^{10}$ cfu scFv-präsentierende Phagen der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) in die erste Runde eingesetzt. Jeweils $5 \cdot 10^{11}$ cfu der angereicherten Phagen wurden für die weiteren Runden verwendet. Nach der Präinkubation wurden die Phagen in die Vertiefungen mit VEEV-TC83 gegeben und für

2 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde zehnmal mit PBST und zehnmal mit PBS gewaschen, bevor die gebundenen Phagen eluiert wurden. Die scFv-präsentierenden Phagen der Antikörpergenbibliothek Heidelberg wurden anschließend mit 200 µL Trypsinlösung für 30 min bei 37 °C eluiert. Im Falle der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) wurden die gebundenen Phagen mit 150 µL Glycinpuffer bei pH 2,2 eluiert, bevor nach 15 min 150 µL Neutralisationspuffer hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die eluierten Phagen in Polypropylenröhrchen überführt.

2.3.5.2 Selektion mit der Antikörpergenbibliothek HAL4/7

Selektion auf direkt immobilisiertem Virusmaterial

Für die Selektionen mit direkt immobilisiertem Antigen wurden jeweils in einer Vertiefung einer Nunc Maxisorp Mikrotiterplatte 100 µL der VEEV-Präparationen (VRS-konzentriertes VEEV-TC83 (2,7 mg/mL), oder Saccharosebett-gereinigtes VEEV-TC83 (1 mg/mL)) mit 50 µL PBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Zusätzlich wurden für die Präselektionen 100 µL VRS-konzentrierter Überstand nicht infizierter Verozellen mit 50 µL PBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Für die Selektion 1/5-VRS wurden sowohl die VRS-konzentrierten Überstände mit und ohne Virus 1 zu 10 verdünnt, und jeweils 100 µL dieser Verdünnung mit 50 µL PBS in fünf Vertiefungen immobilisiert. Anschließend wurden die Kavitäten mit 2 % (w/v) MPBST abgesättigt. Nach 2 h bei RT wurden die Kavitäten dreimal mit PBST gewaschen. Für die Selektion wurden jeweils $5 \cdot 10^{11}$ cfu mit dem Helferphagen Hyperphage verpackte Phagen der HAL4/7 (in gleichen Anteilen) in 150 µL 1 % (w/v) MPBST mit 1 % (w/v) BSA verdünnt. Für die Präselektion wurden die Phagen bei RT für 2,5 h in der Vertiefung mit dem Zellmaterial nicht infizierter Verozellen inkubiert. Danach wurden die Phagen in die Vertiefung für die Positivselektion überführt. Dabei wurde sofort 1/10 des Volumens VRS-konzentrierter Überstand oder Überstand nicht infizierter Verozellen zur Konkurrenz zugefügt. Nach 2 h bei RT wurde 30-mal mit PBST gewaschen, bevor die gebundenen scFv-präsentierenden Phagen mit 200 µL Trypsinlösung für 30 min bei 37 °C eluiert wurden und daraufhin in Polypropylenröhrchen überführt wurden. In der zweiten Runde wurde die Antigenmenge halbiert und die Waschschritte auf 60 erhöht. In der dritten Runde wurden nur $1 \cdot 10^9$ cfu scFv-präsentierende Phagen verwendet. Die Fläche der Präselektion wurde auf zwei Kavitäten je Selektion erhöht und zusätzlich noch 1/10 des Volumens Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen zur Konkurrenz eingesetzt.

Selektion auf mittels Antikörpern immobilisiertem Antigen

Die WIS-mAk VEEV 8747 und VEEWIS1 wurden jeweils in einer Konzentration von 1,5 µg/mL über Nacht bei 4 °C in zwei Vertiefungen einer Nunc Maxisorb Mikrotiterplatte inkubiert und anschließend mit 1 % (w/v) BSA in PBST für 1 h bei RT abgesättigt. Für die Selektion wurden 50 µL VEEV-TC83 VRS (2,7 mg/mL) oder Überstand VEEV-TC83 infizierter Verozellen mit 50 µL 1% BSA in PBST für 1 h bei RT und leichten Schütteln in einer dieser Vertiefungen inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation bei 4 °C über Nacht fortgesetzt. Für die Präselektion wurden 50 µL VRS-konzentrierter Überstand nicht infizierter Verozellen mit 50 µL 1 % BSA in PBST in der verbleibenden Kavität inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten für 2 h mit 2 % (w/v) MPBST abgesättigt, bevor diese dreimal mit PBST gewaschen wurden. Für die Selektion wurden jeweils $5 \cdot 10^{11}$ cfu scFv-präsentierende Phagen der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 (in gleichen Anteilen) in 150 µL 1 % (w/v) MPBST mit 1 % (w/v) BSA verdünnt. Für die Präselektion wurden die Phagen bei RT für 2,5 h in der Vertiefung mit dem Zellmaterial nicht infizierter Verozellen inkubiert. Danach wurde der Überstand in die Vertiefung für die Positivselektion überführt. Dabei wurde sofort 1/10 Volumen VRS oder Überstand von nicht infizierten Verozellen und 5 µg des nicht VEEV-spezifischen murinen WIS-mAk 4G2 zur Konkurrenz zugefügt. Nach 2 h bei RT wurde 30-mal mit PBST gewaschen und anschließend wurden die gebundenen scFv-präsentierenden Phagen mit 200 µL Trypsinlösung für 30 min bei 37 °C eluiert und in Polypropylenröhrchen überführt. In der zweiten Runde wurde die Antigenmenge halbiert und die Anzahl der Waschschritte auf 60 erhöht. In der dritten Runde wurden nur $1 \cdot 10^9$ cfu scFv-präsentierende Phagen verwendet. Die Fläche der Präselektion wurde auf zwei Kavitäten je Selektion erhöht und zusätzlich wurden noch 1/10 des Volumens Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen zur Konkurrenz eingesetzt.

2.3.5.3 Selektion mit der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V_H

Die Selektion VEEV-spezifischer scFv aus der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V_H wurde auf magnetischen Epoxy-Partikeln durchgeführt. Für die Präselektion wurden hierzu 20 µL der Partikel dreimal mit 500 µL Boratpuffer gewaschen und in 190 µL Boratpuffer aufgenommen. 10 µL Überstand nicht infizierter Verozellen (2,7 mg/mL) wurden zu 190 µL magnetischen Partikeln hinzugegeben und über Nacht für die Kopplungsreaktion bei 37 °C im Überkopfschüttler inkubiert (Negativ-Partikel). Für die Positivselektion wurden 50 µL magnetische Partikel dreimal mit 1000 µL Boratpuffer

gewaschen und anschließend in 470 µL dieses Puffers aufgenommen. Zur Kopplung des Fangantikörpers an die Partikel wurden 30 µL WIS-mAk VEEWIS1 (1mg/mL) hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Absättigung der freien Gruppen wurden zu beiden Ansätzen 10 % des Endvolumens 1 M Ethanolamin zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Partikel in ihrem Ausgangsvolumen (50 µL bzw. 20 µL) PBS aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt. 5 µL Ak- und 5 µL Negativ-Partikel wurden für 30 min in 1 mL 1 % (w/v) MPBST mit 1 % (w/v) BSA bei RT abgesättigt und anschließend zweimal mit 1 mL PBST gewaschen. In der ersten Selektionsrunde wurden $2 \cdot 10^{11}$ cfu mit dem Helferphagen M13K07 verpackte Phagen der Antikörpergenbibliothek auf Negativmaterial in 1 mL Panningblock für 2,5 h bei RT inkubiert. Zeitgleich wurden 10 µL Ak-Partikel in 2 mL PBST mit 1 % BSA für 1 h bei RT abgesättigt und anschließend zweimal mit 1 mL PBST gewaschen. Zur Virusimmobilisierung wurde die Hälfte dieser Partikel in 500 µL $4 \cdot 10^8$ KID₅₀/mL β-Propionlaktam inaktivierter VEEV-enthaltender Überstand mit 1,5 mL PBST mit 1 % (v/v) FCS aufgenommen und für 2,5 h bei RT inkubiert. Für eine zweite Präselektion wurde die andere Hälfte der magnetischen Partikel mit 250 µL Überstand nicht infizierter Verozellen und 750 µL PBST mit 1 % (w/v) BSA für 2 h inkubiert. Danach wurden beide Ansätze zweimal mit 1 mL PBST gewaschen. Zum stringenteren Blocken der Partikel wurden diese in jeweils 1 mL 2 % (w/v) MPBST für 30 min bei RT abgesättigt und danach zweimal mit 1 mL PBST gewaschen. Es folgte die Überführung der Phagen auf die Partikel für den zweiten Selektionsschritt mit anschließender Inkubationszeit von 2,5 h bei RT. Danach wurde der Überstand mit den ungebundenen Phagen auf die Partikel mit immobilisiertem Virus überführt. Dabei wurden 30 µg eines murinen IgG1 (Anti-Profilin 2, 250 µg/mL, Zellüberstand, d. h. 10-facher Überschuß) in Lösung zugegeben. Nach 2 h bei RT wurden die Partikel dreimal mit 1 mL PBST gewaschen und in 1 mL 1 % (w/v) MPBST aufgenommen. Jeweils 500 µL Suspension mit magnetischen Partikeln wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL 1 % (w/v) MPBST überführt. In einer der beiden Selektionen wurden 5 µg des humanen scFv-Fc-Fusionsproteins vom Originalklon MK220-IG12 zugegeben. Beide Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit 1 mL PBST wurden die Partikel in jeweils 200 µL Trypsinlösung für 30 min bei 37 °C inkubiert und in ein Polypropylenröhrchen überführt. In der zweiten Selektionsrunde wurden $2 \cdot 10^9$ cfu scFv-präsentierende Phagen in die Selektion eingesetzt.

2.3.6 Infektion von *E. coli*-Zellen mit eluierten Phagen

Im Falle der Verwendung von aktivem Virusmaterial zur Selektion sowie Trypsinlösung zur Elution, wurden nach der Elution der Phagen möglicherweise noch enthaltende Viruspartikel inaktiviert. Hierzu wurde zu der Lösung mit den eluierten Phagen noch 100 µL Glycinpuffer und nach 15 min noch 100 µL Neutralisationspuffer zugefügt. 10 µL dieser Phagenlösung wurden anschließend für die Titerung der eluierten Phagen verdünnt. Für die anschließende Infektion von Bakterien mit den eluierten Phagen wurde 2xTY-T-Medium mit einer ÜNK von *E. coli XL1-Blue*-Zellen auf eine $OD_{600}=0,1$ angeimpft. Nach der Inkubation der Bakterien bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer $OD_{600}=0,4-0,5$ wurden 10-20 mL dieser Bakterienkultur mit den eluierten Phagen vereint. Zu 10 µL der verdünnten Phagen wurden jeweils 50 µL der *E. coli XL1-Blue*-Kultur gegeben. Nach 30 min bei 37 °C wurden die Proben der verdünnten Phagenlösungen auf 10 cm 2xTY-GA-Agarplatten ausplattiert und die restliche Kultur, die mit den eluierten Phagen inkubiert wurde, wurde anschließend 10 min bei 3220 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in ca. 200 µL Medium resuspendiert und anschließend auf einer 20 cm 2x-TY-GA-Agarplatte ausplattiert. Diese Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Phagenproduktion eingesetzt.

2.3.7 Produktion von scFv-präsentierenden Phagen

Die Bakterienkolonien von einer 2xTY-GA-Agarplatte wurden mit 5 mL 2xTY-GA-Medium abgelöst und in ein Polypropylenröhrchen überführt. 50 mL 2xTY-GA wurden mit dieser Zellsuspension auf eine $OD_{600}=0,1$ angeimpft. 800 µL der restlichen Bakterien wurden mit 200 µL 90 % Glycerin versetzt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Falle der Produktion monoklonaler scFv-präsentierender Phagen wurde zum Animpfen des Mediums eine 5 mL Übernachtskultur monoklonaler *E. coli XL1-Blue*-Zellen in 2xTY-GA-Medium verwendet. Nach Inkubation der Bakterienkulturen bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer $OD_{600}=0,4-0,5$ wurden 2 mL (monoklonal) oder 10 mL (polyklonal) mit dem Helferphagen M13K07 im Verhältnis 1:20 für 30 min bei 37 °C einmal ohne Schütteln und anschließend einmal bei 200 rpm inkubiert. Nur im Falle der Verpackung von Antikörpergenbibliotheken wurde hierfür der Helferphage Hyperphage verwendet. Anschließend wurden die Bakterien bei 3220 xg für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µL 2xTY-AK-Medium resuspendiert und in 30 mL 2xTY-AK-Medium gegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 30 °C und 250 rpm wurden die Bakterien für 10 min bei

3220 xg und 4 °C in einem Polypropylenröhrchen abzentrifugiert. In einem neuen Polypropylenröhrchen wurde der Zentrifugationsschritt mit dem Überstand wiederholt. Danach wurde 1/5 des Endvolumens PEG/NaCl-Lösung zu dem Überstand hinzugegeben, gemischt und für 1 h auf einer Wippe auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 1 h bei 3220 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Phagenpellet wurde getrocknet, in 500 µL Phagenlösungspuffer resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Restliche Bakterien wurden bei 15400 xg für 1 min sedimentiert und der Überstand in ein 2 mL Schraubgefäß überführt. Die auf diese Weise erhaltenen scFv-präsentierenden Phagen wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.8 Titerbestimmung von M13-Phagen

Zur Quantifizierung hergestellter Phagen wurde eine Titerbestimmung durchgeführt. Hierbei wird nach erfolgter Infektion von *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit M13-Phagen die Anzahl der dadurch Antibiotika resistenten Bakterien bestimmt. Mit 500 µL einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden 50 mL 2xTY-T-Medium angeimpft. Anschließend wurden die Bakterien bei 250 rpm und 37 °C inkubiert, bis die Zellsuspension eine optische Dichte $OD_{600}=0,4-0,5$ hatte. Parallel dazu wurden die zu bestimmenden Phagenlösungen mit PBS verdünnt. Zur Infektion wurden zu 50 µL der Bakterienkultur 10 µL der entsprechend verdünnten Phagenlösungen pipettiert. Nach 30 min bei 37 °C ohne Schütteln wurden dreimal 10 µL eines jeden Ansatzes auf eine 2xTY-GA-Agarplatte aufgetropft oder komplett ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C inkubiert. Durch Auszählen der Bakterienkolonien bei verschiedenen Verdünnungen ergab sich der Titer der Phagenlösung [cfu/mL].

2.3.9 Produktion von scFv oder scFv-pIII-Fusionsproteinen

Es wurden jeweils 180 µL 2xTY-GA-Medium in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte aus Polypropylen mit monoklonalen Bakterien, die eines der Plasmide pHAL14-scFv, pSEX81-scFv, pIT2-scFv oder pOPE101-scFv enthielten, angeimpft und bei 37 °C und 1200 rpm über Nacht inkubiert. Danach wurden 10 µL der ÜNK in eine zuvor mit 180 µL 2xTY-GA-Medium gefüllte Vertiefung überführt und anschließend für 2 h bei 1200 rpm inkubiert. Die restliche ÜNK wurde mit 25 µL 87 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Nach 2 h wurden die Bakterien für 10 min bei 3220 xg abzentrifugiert und

die Zellpellets jeweils in 180 µL 2xTY-A Medium mit 50 µM IPTG resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 1200 rpm wurden die Zellen 10 min bei 3220 xg sedimentiert, der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt und bei 4 °C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293-T-Zellen wurden bei 37 °C, 96 % Luftfeuchtigkeit und 7 % CO₂ kultiviert. Zur Passagierung der adhärennten Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Ein Teil dieser abgelösten Zellen wurde in eine Zellkulturschale mit 10 mL auf 37°C vorgewärmten DMEM-Medium (*High Glucose*) mit 8 % FCS und mit 1 % Penicillin/Streptomycin überführt.

2.4.2 Transfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden für die Produktion der scFv-Fc-Fusionsproteine mit HEKfectin transfiziert. Hierzu wurden HEK-293T Zellen so verdünnt ausplattiert, daß sie nach 24 h zu 60 % konfluent waren. Die Transfektion wurde entweder in einer Kavität einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen oder in einer Zellkulturschale durchgeführt. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers des HEKfectins.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Reinigung der scFv-Fc-Fusionsproteine über Protein A

Zur Reinigung der scFv-Fc-Fusionsproteine wurden 1 mL-Säulen (HiTrap Protein-A-Sepharose) bei einer Flußrate von 1 mL/min in der Anlage ÄKTA-Prime betrieben. Zuerst wurde die Säule mit ca. 15 mL filtriertem Bindepuffer equilibriert. Anschließend wurde der filtrierte Kulturüberstand der Produktion auf die Säule appliziert

und danach solange mit Bindepuffer nachgespült, bis erneut die Basislinie bei der Detektion A_{280} erreicht wurden. Dieses Waschen wurde mit dem Waschpuffer wiederholt, bevor die gebundenen Fusionsproteine mit dem Elutionspuffer (pH 2,5) eluiert wurden. Durch Vorlage von je 165 μL des Neutralisierungspuffers (pH 9) in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurde der pH-Wert der 1 mL großen Fraktionen direkt nach der Elution neutralisiert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford beruht auf der Anlagerung des Farbstoffs Coomassie an Proteine und die damit verbundene Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs. Für die Bestimmung wurde das fünffach Konzentrat der Bradfordreagenz nach Herstellerangaben verdünnt mit Wasser verdünnt. Für die Konzentrationsbestimmung der Präparationen von scFv- und scFv-Fc-Fusionsproteinen wurde als IgG-Standard der Antikörper Herceptin in Konzentrationen zwischen 0 und 100 $\mu\text{g/mL}$ für die Kalibriergerade verwendet. Zu je 75 μL jeder Proteinverdünnung des Standards und der Proben wurden 75 μL verdünnte Bradfordreagenzlösung in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach 20-40 min bei RT wurden die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Unter Berücksichtigung der Kalibriergeraden konnten anschließend die Konzentrationen der Proteinpräparationen aus den Absorptionen ermittelt werden.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung der scFv-Fc-Fusionsproteine mittels Human-Capture-ELISA

Zur Abschätzung der produzierten Menge der scFv-Fc-Fusionsproteine wurde ein *Human-Capture-ELISA* durchgeführt. Zuerst wurden 100 μL des Ak Anti-Human-IgG (1:5700) in Natriumcarbonatpuffer für 30 min bei 37 °C in jeweils einer Vertiefung einer Falcon- Mikrotiterplatte inkubiert. Zum Absättigen der Oberfläche folgte die Zugabe von 100 μL FCS je Kavität. Nach 30 min bei 37 °C wurde dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der zu bestimmenden Proben und des Protein-N-Standards in IgG-Konzentrationen zwischen 1-165 ng/mL für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST folgte die Inkubation mit 100 μL

des Ak Anti-Human-POD (1:20000) verdünnt in PBS mit 50 % (v/v) FCS für 1 h bei 37 °C. Es wurde noch dreimal mit PBST gewaschen, bevor durch Zugabe von 100 µL TMB je Kavität die Färbung durchgeführt wurde. Anschließend wurde mit 100 µL einer 1 N H₂SO₄ je Vertiefung die Reaktion abgestoppt. Es wurde Differenz der Absorptionen bei den Wellenlängen von 450 nm und 620 nm bestimmt.

2.5.4 Antigen-ELISA

Zur Immobilisierung wurden 100 µL der jeweiligen Antigene in PBS in den Vertiefungen einer Nunc Maxisorb Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Kavitäten dreimal mit PBST gewaschen. Bei Virusmaterial und Material nicht infizierter Verozellen wurde dies im WIS durchgeführt. Falls dieser ELISA mit inaktivierten Virusmaterial durchgeführt werden sollten, wurden dort die Kavitäten für 1 h bei 4 °C mit 2,5 % (v/v) Formalinlösung überschichtet, bevor erneut dreimal gewaschen wurde. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 2 % (w/v) MPBST oder im Falle der scFv-Fc-Fusionsproteine optional mit 1 % (v/v) FCS in PBST abgesättigt, bevor sie erneut dreimal mit PBST gewaschen wurden. Nun wurden scFv-präsentierende Phagen oder lösliche scFv in 100 µL 2 % (w/v) MPBST in den Kavitäten für 1,5 h inkubiert. Die scFv-Fc-Fusionsproteine wurden in 100 µL PBST mit 1 % (v/v) FCS oder 2 % (w/v) MPBST verdünnt und ebenso für 1,5 h inkubiert, bevor erneut alle Kavitäten dreimal gewaschen wurden. Gebundene scFv-präsentierende Phagen wurden mittels des Ak anti-M13-POD (1:5000) und lösliche scFv mittels der Ak Anti-(c)myc (9E10) (verschiedene Verdünnungen je nach Ak-Konzentration im Überstand 1:10 bis 1:30) und Anti-Maus-POD (1:10000) jeweils in 100 µL 2 % (w/v) MPBST detektiert. Gebundene scFv-Fc-Fusionsproteine wurden mittels des Ak Anti-Human-IgG-γ-Kette-POD (1:10000) in 100 µL PBST mit 1 % (v/v) FCS nachgewiesen. Nach dreimal Waschen mit PBST wurde die Färbung mit dem Substrat TMB durchgeführt. Nach ca. 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL 1 N Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.5.5 Bestimmung der Kreuzreaktivität mittels Sandwich-ELISA

Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurden verschiedene Viren über adsorptiv immobilisierte Fangantikörper aus Zellkulturüberstand konzentriert. Hierzu wurden die

VEEV-Stämme TC83, 230 und H12/93 mittels des WIS-mAk VEEWIS1 (3 µg/mL) spezifisch aus dem Überstand angereichert. Die anderen Alphaviren EEEV, WEEV und CHIK wurden mittels der WIS-mAk 3/4, 12/2 und VEEWIS1 (insgesamt 3 µg/mL) spezifisch aus dem Überstand angereichert. Als Negativkontrolle wurde Überstand nicht infizierter Verozellen in Kavitäten mit VEEWIS1 und mAk-Mix inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten mit 2 % (w/v) MPBST abgesättigt, bevor erneut dreimal gewaschen wurde. Nach 2 h Inkubationszeit mit je $1 \cdot 10^9$ cfu eingesetzten scFv-präsentierenden Phagen und anschließenden dreimaligem Waschen mit PBST wurden die gebundenen Phagen mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) nachgewiesen. Die Detektion der VEEV-Stämme erfolgte zudem über den biotinylierten WIS-mAk 8/6 (1:10000). Die Detektion der anderen Alphaviren erfolgte mittels der biotinylierten WIS-mAk 8/6 (1:10000), VEEWIS1 (1:10000), 12/2 (1:5000) und 42/2 (1:2000). Die gebundenen biotinylierten Ak wurden nach erneutem Waschen über Streptavidin-POD (1:4000) für 30 min nachgewiesen. Die Entwicklung wurde mit dem Substrat TMB durchgeführt. Nach ca. 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL 1 N Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.5.6 SDS-PAGE

Für eine SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches SDS-Gel hergestellt. Dafür wurden je ein Trenn- und ein Sammelgel nach folgender Tabelle angesetzt:

Tab. 2.10: Ansätze für eine SDS-Gel

| Komponente | Trenngel | | Sammelgel | |
|--------------|------------------------|---------|-----------|--------|
| Tris-HCl | pH= 8,8 | 1000 µL | pH= 6,8 | 200 µL |
| Acrylamidmix | 1300-1600 µL | | 260 µL | |
| 10 % SDS | 40 µL | | 15 µL | |
| Temed | 2 µL | | 2 µL | |
| APS | 40 µL | | 15 µL | |
| Wasser | 2900 µL – Acrylamidmix | | 1000 µL | |

Je nach Größe der aufzutrennende Proteine wurden 10-12 % PAA-Trenngele hergestellt. Auf das auspolymerisierte Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und der entsprechende Probenkamm inseriert. Die Proben wurden unterdessen mit fünffach Laemmli-puffer versetzt. Die Ansätze wurden für 2-5 min in reduzierendem Laemmli-puffer auf 95 °C oder für 20 min in nicht-reduzierendem Laemmli-puffer auf 56 °C erhitzt. Auf das auspolymerisierte Trenngel aufgetragen wurden die Proben bei einer Stromstärke von 20 mA bis zu 1 h elektrophoretisch getrennt.

2.5.7 Silberfärbung

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese für mindestens 2 h in Fixierer gelegt. Nach dreimaliger Inkubation für 20 min in 50 % (v/v) Ethanol wurde es für 1 min in Natriumthiosulfatlösung überführt. Nach 20 sekündigem Waschen in Wasser wurde das Gel für 20 min in Silberlösung gefärbt. Nach zwei weiteren analogen Waschschritten mit Wasser wurde es in Entwickler überführt. Bei ausreichender Färbung wurde das Gel zweimal für 2 min mit Wasser gewaschen, bevor die Entwicklungsreaktion durch die Überführung in Stopplösung beendet wurde. Nach 1 h wurde das Gel in Wasser gelagert.

2.5.8 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Färbung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Blau wurde das SDS-Gel nach der Elektrophorese für 1 h in Coomassie-Färber inkubiert. Zum Entfärben des Gels wurde es in Coomassie-Entfärber mit einem Stück Cellulose zum Aufnehmen des ausgewaschenen Coomassie inkubiert. Nach dem Entfärben wurde das Gel in Wasser gelagert.

2.5.9 Western Blot

Das Verfahren Western Blot beschreibt das Übertragen von Proteinen auf eine Membran. Hierzu wurde ein in Laufpuffer eingetauchtes Filterpapier auf die Transfereinheit aufgelegt. Danach wurden die durch Eintauchen in Methanol aktivierte PVDF-Membran, dann das Polyacrylamidgel und abschließend ein in Laufpuffer eingetauchtes Filterpapier aufgelegt. Der anschließende Transfer wurde für 45 min mit 600 mA bei max. 20 V durchgeführt.

2.5.10 Immunfärbung

Für eine Immunfärbung wurde die geblottete PVDF-Membran entweder für mindestens 45 min bei RT in 2 % (w/v) MPBST oder für 15 min mit einer 2 % (v/v) Tweenlösung abgesättigt. Danach folgte eine Inkubation für mindestens 1,5 h mit dem jeweiligen

Erstantikörper. Nach zwei Waschschritten mit PBST wurde die PVDF-Membran für 1 h in 2 % (w/v) MPBST mit dem jeweiligen Zweitantikörper inkubiert. Danach folgten weitere zwei Waschschrritte mit PBST und einer mit dem Substratpuffer. Bei AP-konjugierten Zweitantikörpern wurde das Substrat NBT/BCIP und bei POD-konjugierten Zweitantikörpern das Substrat DAB verwendet. Nach ausreichender Färbung wurde zum Abstoppen der Reaktion die Membran mit Wasser gespült.

2.5.11 Immunhistochemische Färbung VEEV-infizierter Verozellen

Für die Färbung wurden je $3 \cdot 10^3$ Verozellen in 100 μ L Medium in eine Vertiefung einer Mikrotiterzellkulturschale ausgesäht und für 24 h bei 37 °C und 4 % CO₂ kultiviert. Zu den Zellen wurden dann optional $6 \cdot 10^3$ KID₅₀/mL VEEV-TC83 gegeben und diese anschließend für 24 h weiter inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2,5 % (v/v) Formalinlösung überschichtet und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Kavitäten mit 2 % (w/v) MPBST abgesättigt, bevor jeweils $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$ scFv-präsentierende Phagen in 100 μ L 2 % (w/v) MPBST für 2 h bei RT inkubiert wurden. Die gebundenen Phagen wurden mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) in 2 % (w/v) MPBST detektiert. Die Färbung wurde mit jeweils 100 μ L AEC-Lösung für 30 min durchgeführt und danach durch mehrmaliges Waschen mit Wasser abgestoppt. Die Färbung der Zellen wurden an einem inversen Lichtmikroskop ausgewertet.

2.5.12 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D

VEEV-spezifischer Antikörper mittels

Oberflächenplasmonresonanz

Zur Affinitätsbestimmung von VEEV-spezifischen Antikörpern wurden der Chip CM3 der Firma Biacore mit einer verkürzten Dextranmatrix verwendet. Für den nachfolgenden Versuch wurden nur Reagenzien der Firma GE Healthcare verwendet. Für die Immobilisierung des Fang-Ak VEEWIS1 musste die Matrix unter einem Fluss von 10 μ L/min und 25 °C durch siebenminütige Injektion mit einer Mischung von 0,1 M NHS (in Wasser, ein Teil) und 0,4 M EDC (in Wasser, ein Teil) mittels der Aufgabeoption QUICKINJECT aktiviert werden. 11,4 μ L des WIS-mAk VEEWIS1 (1 mg/mL in

0,1 M Carbonatpuffer, pH 8) wurden mit 27,3 μ L 100 mM HCl und 188,4 μ L 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 zur Absenkung des pH-Werts auf pH 4,5 und der Konzentration auf 50 μ g/mL verdünnt. Diese Ak-Lösung wurde danach für 10 min über eine Kammer der vier Kammern des CM3-Chips injiziert. Danach wurde 7 min mit 1 M Ethanolamin (pH 8,5) die reaktiven Gruppen in der Kammer abgesättigt. Die Immobilisierung des Fang-Ak wurde in einer weiteren Kammer für die Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Auswertung mit der Biaevaluation-Software wurde die Differenz der Bindungsverläufe des Ak in beiden Kammern mit Fang-Ak analysiert. Nachdem der Chip nach mehreren Regenerationszyklen mit Glycinpuffer (0,01 M pH 2) und Triton (0,05 % in PBS) eine stabile Basislinie aufwies, wurden für die verschiedenen Läufe 75 μ L VEEV ($4 \cdot 10^8$ KID₅₀/mL) in einer Kammer bei einem Fluss von 3 μ L/min mittels QUICKINJECT injiziert. Nach 6 min wurden bei einem Fluss von 30 μ L/min 300 μ L der entsprechenden Ak-Verdünnung in dem Laufpuffer PBS mit 0,005 % Tween durch alle 4 Kammern mittels KINJECT injiziert. Nach 4-minütiger Dissoziationszeit wurde durch Spülen mit 70 μ L Tritonlösung (0,05 % in PBS), zweimal 15 μ L und einmal 10 μ L Glycinpuffer (0,01 M, pH 2) der Chip regeneriert.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus den Antikörpergenbibliotheken Tomlinson (I+J) und Heidelberg

3.1.1 Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente

Zu Beginn dieser Arbeit standen die zwei Antikörpergenbibliotheken Tomlinson (I+J) (Goletz *et al.*, 2002) und Heidelberg (Dübel *et al.*, nicht veröffentlicht) zur Verfügung. Die erstgenannte, semisynthetische scFv-Genbibliothek beruht auf den humanen Gerüstregionen der Keimbahnlinien HV3-23/DP-47 und HJ4b der schweren Kette, sowie LV O12/O2/DP-K9 und KJ1 der leichten Kette. Diese Bibliothek beinhaltet theoretisch bis zu $2,8 \cdot 10^8$ verschiedene Antikörpergenfragmente. Die naive Antikörpergenbibliothek Heidelberg basiert auf dem Phagen-Display-Vektor pSEX81 (Breitling *et al.*, 1991) und umfasst theoretisch bis zu $5 \cdot 10^8$ scFv-Gene.

Zur Selektion von Antikörperfragmenten gegen VEEV wurde der attenuierte Impfstamm VEEV-TC83 verwendet (Berge *et al.*, 1961). Da Impfungen mit diesem Stamm schwerwiegende Nebenwirkungen bei Menschen verursachen können (Phillipotts *et al.*, 2002), unterliegt dieser den Auflagen der erhöhten Risikogruppe L3. Die Herstellung von VEEV-TC83 und alle Experimente, bei denen aktive Viruspräparationen eingesetzt wurden, wurden in den L3-Laboratorien des Wehrwissenschaftlichen Instituts der Bundeswehr (WIS), Munster, durchgeführt.

Für die Isolierung VEEV-spezifischer, scFv-präsentierender Phagen wurden aktive Viren des Stammes VEEV-TC83 eingesetzt, welche mittels des *Virus Recovery System* (VRS) und anschließender CsCl-Gradienten-Zentrifugation konzentriert und gereinigt worden waren. Die Anreicherung von Viruspartikeln mit diesem System beruht auf der Interaktion der Sulfateterminatrix des VRS mit der Oberflächenladung umhüllter Viren. Für die Selektion wurden scFv-präsentierende Phagen beider Antikörpergenbibliotheken verwendet, die mit dem Helferphagen Hyperphage (Rondot *et al.*, 2001) generiert worden waren. Zur Anreicherung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente wurden vier Selektionsrunden auf adsorptiv immobilisiertem Antigen in Mikrotiterplatten durchgeführt, bei denen jeweils die Antigenmenge reduziert und die Anzahl der Waschschr

wurde. Zur Analyse der Spezifität der angereicherten Phagen wurde ein Antigen-ELISA mit VRS-konzentriertem VEEV-TC83 und 1:50 verdünntem Überstand nicht infizierter Verozellen durchgeführt, in den aus jeder Selektionsrunde $5 \cdot 10^9$ cfu polyklonale Phagen eingesetzt wurden (Abb. 3.1). Die gebundenen Phagen wurden mittels des Antikörpers Anti-M13-POD detektiert, welcher die Phagenpartikel über ein Epitop des Phagenhüllproteins pVIII erkennt.

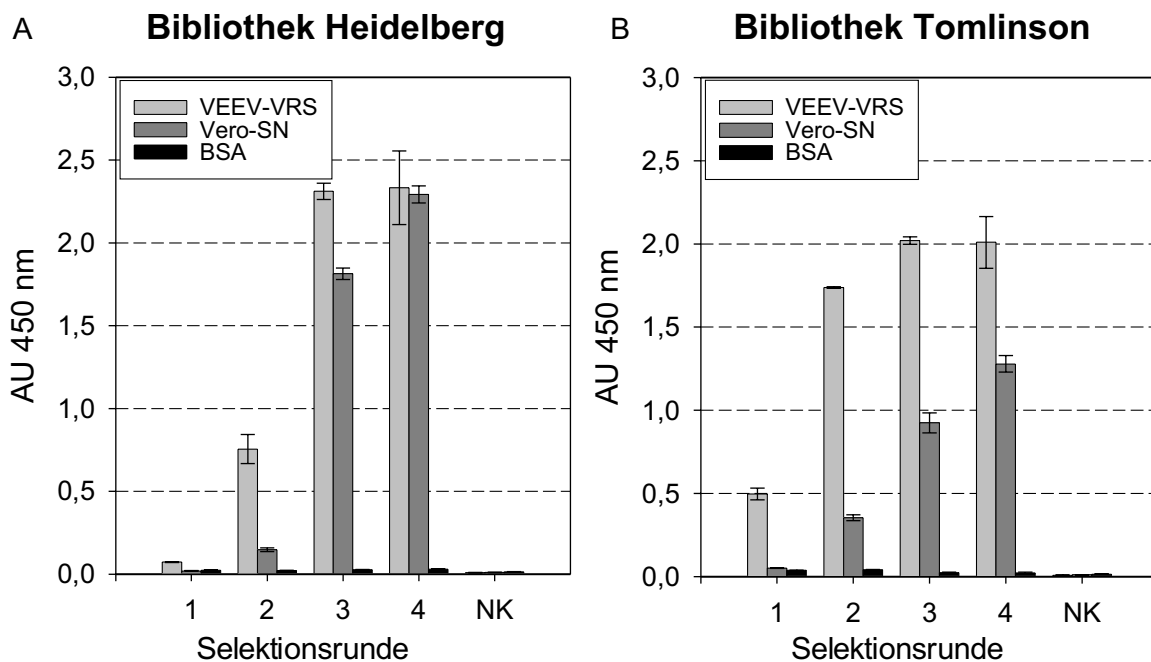


Abb. 3.1: Antigen-ELISA polyklonaler Phagen der Selektionen aus den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg (A) und Tomlinson (I+J) (B) 1 µg VRS-konzentriertes VEEV-TC83 (VEEV-VRS), BSA oder 1:50 verdünnter Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen (Vero-SN) wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin und das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis von $5 \cdot 10^9$ cfu eingesetzten Phagen aus jeder Selektionsrunde erfolgte mittels des Antikörpers Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB. NK bezeichnet die Negativkontrolle, die ohne Phagen durchgeführt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen im ELISA mit Standardabweichung.

Die aus den beiden Antikörpergenbibliotheken angereicherten, scFv-präsentierenden Phagen erkannten sowohl VRS-konzentriertes VEEV-TC83 als auch den Überstand nicht infizierter Verozellen. Die vierte Selektionsrunde führte nur zur weiteren Anreicherung von Phagen, die Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen erkannten. Eine unspezifische Bindung der polyklonalen Phagen an BSA erfolgte nicht.

3.1.2 Analyse von Einzelklonen

Im Anschluss an die Selektionen wurden jeweils 46 Einzelklone aus der 2. Selektionsrunde und 138 Einzelklone aus der 3. Selektionsrunde mittels Antigen-ELISA untersucht, da in diesen Runden die Anreicherung VEEV-spezifischer Phagen am stärksten erschien (Abb. 3.1). In Mikrotiterplatten wurden hierzu Einzelklone aus den jeweiligen Selektionsrunden kultiviert, die Expression der scFv-Gene mittels IPTG induziert und abschließend zur Freisetzung der produzierten scFv aus dem Periplasma eine partielle Zellyse mittels Detergenz durchgeführt. Im Falle der Antikörpergenbibliothek Heidelberg wurden ausschließlich Fusionsproteine bestehend aus dem jeweiligen Antikörperfragment und dem Phagenprotein pIII produziert. Im Falle der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) ermöglicht das, auf dem Phagemid zwischen der cDNA dieser beiden Proteine integrierte, Amber-Stoppkodon die direkte Produktion löslicher, nicht an das Phagenprotein-fusionierter scFv. Zur Bestimmung der Spezifität der Klone wurde die Bindung der produzierten scFv bzw. scFv-pIII-Fusionsproteine an VRS-konzentriertes VEEV-TC83 und an Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen im Antigen-ELISA überprüft. Exemplarisch ist in Abb. 3.2 die Analyse von 96 Einzelklonen der Antikörpergenbibliothek Heidelberg aus der 3. Selektionsrunde dargestellt.

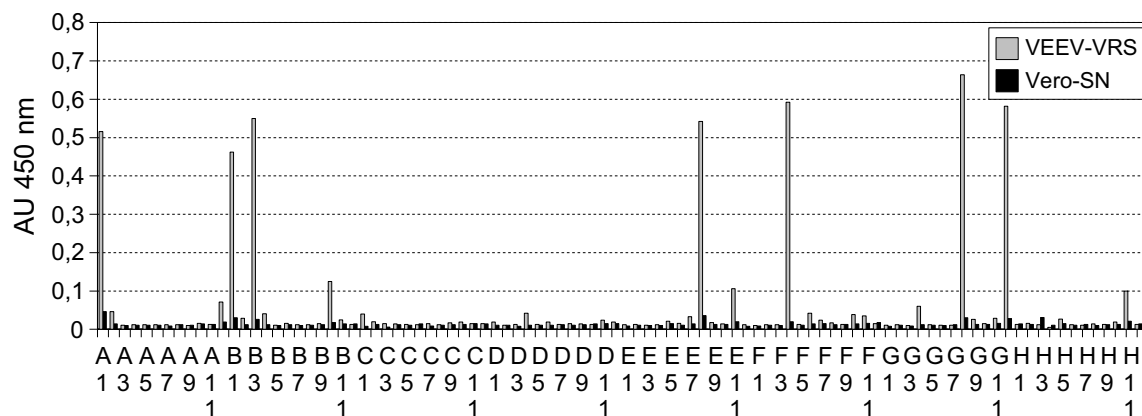


Abb. 3.2: Antigen-ELISA monoklonaler scFv-pIII-Fusionsproteine von Einzelklonen der 3. Selektionsrunde aus der Antikörpergenbibliothek Heidelberg
1 µg VEEV-TC83-VRS oder Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen (Vero-SN), 1:50 verdünnt, wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin und das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis der aus 20 µL Überstand gebundenen scFv erfolgte über das fusionierte Phagenprotein pIII (Anti-pIII, 1:1000). Die Farbreaktion erfolgte durch den Ak Anti-Maus-Fc-POD (1:10000) mit dem Substrat TMB.

Insgesamt wurden elf Antikörperfragmente aus der Antikörpergenbibliothek Heidelberg und sieben aus der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) isoliert, die im Antigen-ELISA VRS-konzentriertes VEEV-TC83 erkannten. Für keinen aller untersuchten scFv konnte eine Bindung an Überstand nicht infizierter Verozellen nachgewiesen

werden. Von den achtzehn positiv getesteten scFv wurde die entsprechende DNA sequenziert. Es wurden insgesamt neun unterschiedliche scFv-Gene identifiziert, aus denen fünf der Antikörpergenbibliothek Heidelberg (MK220) und vier der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) (MK221) entstammten (Keimbahnlinien siehe Anhang).

3.1.3 Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen der selektierten Antikörperfragmente

Für die weitere Charakterisierung wurden scFv-Fc-Fusionsproteine der erhaltenen Antikörperfragmente generiert. Diese Fusionsproteine besitzen die Vorteile einer höheren Stabilität, eines schnelleren Nachweises und eines möglichen Aviditätseffekts. Hierzu wurden die Gene der identifizierten Antikörperfragmente in den Zielvektor pCMV-hlgG1-Fc-XP inseriert, der eine Expressionskassette für die Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen in Säugerzellen mit CMV-Promotor, Signalsequenz, Klonierungskassette für das scFv-Gen, sowie cDNA der *hinge*-, C_H2- und C_H3-Domäne eines humanen IgG1 enthält. Zusätzlich wurde das scFv-Gen des Mucin1-spezifischen Antikörperfragments IIB6 (Tolékis, 2002) in diesen Zielvektor kloniert, da dieses Fragment als Negativkontrolle für die weitere Analyse verwendet werden sollte. Für die Klonierung wurden die scFv-Gene mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Not*I aus den Phagen-Display-Vektoren pSEX81 (Breitling *et al.*, 1991) und pIT2 (Goletz *et al.*, 2002) geschnitten. Nach der analogen Behandlung des Zielvektors pCMV-hlgG1-Fc-XP wurde dieser anschließend dephosphoryliert. Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung wurden die gereinigten Antikörpergenfragmente mittels Ligation in den präparierten Vektor pCMV-hlgG1-Fc-XP inseriert. Nach Transformation von *E. coli XL1-Blue*-Zellen wurde die Insertion der scFv-Gene durch PCR mit den Oligonukleotiden pCMV-hlgG1-Fc_f und pCMV-hlgG1-Fc_r überprüft und nachfolgend die PCR-Produkte sequenziert. Für eine transiente Expression der scFv-Fc-Gene wurden HEK293T-Zellen mit den generierten Plasmiden transfiziert. Die nach der Transfektion gesammelten Überstände wurden über eine Protein A-Säule gereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung der gereinigten scFv-Fc-Fusionsproteine mittels Bradford-Assay und *Human-Capture*-ELISA wurde die Reinheit der Fraktionen durch elektrophoretische Auftrennung überprüft. Exemplarisch sind in Abb. 3.3 die gereinigten Fraktionen der Fusionsproteine der selektierten Antikörperfragmente MK221-IA7, MK220-IG12 und des Kontrollantikörperfragments IIB6 dargestellt.

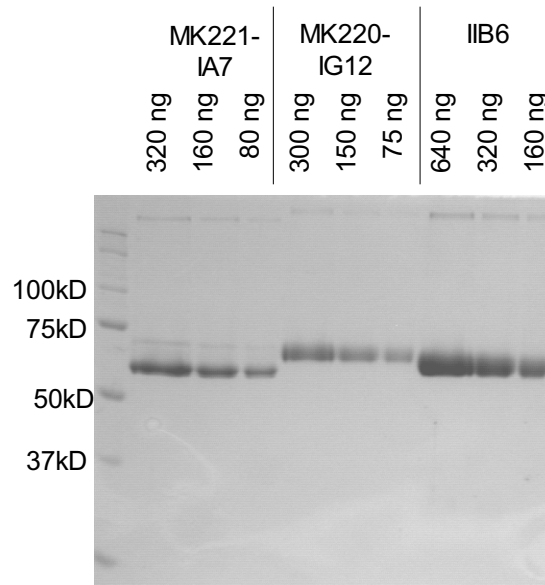


Abb. 3.3: Coomassie angefärbte scFv-Fc-Fusionsproteine nach elektrophoretischer Auftrennung

10 % SDS-Gel mit elektrophoretisch aufgetrennten denaturierten scFv-Fc-Fusionsproteinen (95 °C, 2 min, reduzierender Laemmli-Puffer). Die Proteinmenge wurde mittels Bradford-Assay und *Human-Capture-ELISA* bestimmt. Die Anfärbung von Proteinen erfolgte mittels Coomassie.

Die theoretische Molekularmasse der erzeugten scFv-Fc-Fusionsproteine entspricht ohne Berücksichtigung der Zuckerstrukturen im nicht reduzierten Zustand ca. 115 kD. Nach Reduktion der Disulfidbrücken wurde jeweils hauptsächlich ein Protein bei ungefähr 60 kD nachgewiesen, was der theoretischen molekularen Masse einer Polypeptidkette des scFv-Fc-Fusionsproteins entspricht.

3.1.4 Spezifitätsbestimmung der scFv-Fc-Fusionsproteine

Die gereinigten Fusionsproteine wurden in einen Antigen-ELISA zur Detektion von adsorptiv immobilisiertem VEEV-TC83 eingesetzt (Abb. 3.4). Zur Kontrolle der Spezifität der scFv-Fc-Fusionsproteine wurde, parallel zu Virusantigen, Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen VRS-konzentriert (Vero-VRS). Anschließend wurden die VRS-Präparationen, mit und ohne VEEV-TC83, sowie das Kontrollantigen Lysozym adsorptiv für den Antigen-ELISA immobilisiert.

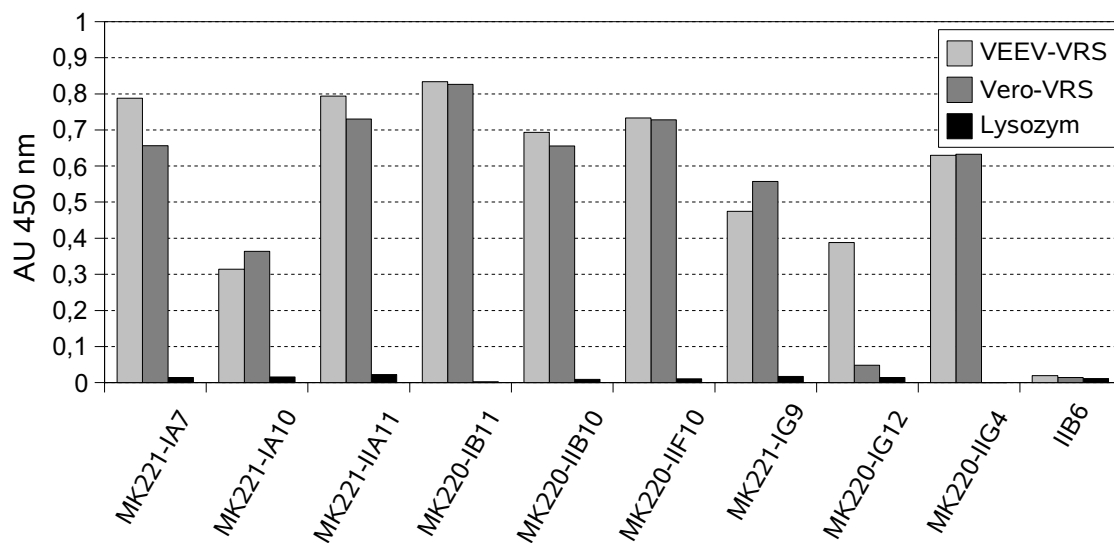


Abb. 3.4: Antigen-ELISA der monoklonalen scFv-Fc-Fusionsproteine

1 µg VEEV-TC83-VRS oder Zellkulturüberstand nicht infizierter Verozellen 1:50 verdünnt wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin und das Absättigen mit 2 % MPBST. Je 100 ng scFv-Fc-Fusionsprotein wurden pro Kavität inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels des Antikörper Anti-Human-IgG-γ-Kette-POD (1:20000) und dem Substrat TMB. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen im ELISA.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (Vero-VRS) zeigte sich, dass alle scFv-Fc-Fusionsproteine, außer die des Fragments MK220-IG12, spezifisch einen Bestandteil des VRS-konzentrierten Zellkulturüberstandes auch nicht infizierter Verozellen erkannten. Aus diesem Grund wurde nachfolgend von diesen Antikörperfragmenten nur das Fragment MK220-IG12 auf seine immunologischen Bindungseigenschaften hin charakterisiert. Um zusätzliche VEEV-spezifische Antikörperfragmente zu isolieren, wurden weitere Selektionen und die Optimierung des Klons MK220-IG12 mittels V_L -Kettenaustausch durchgeführt.

3.2 Gewinnung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus der Antikörpergenbibliothek HAL4/7

3.2.1 Strategien zur Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente

Nachdem mittels der durchgeführten Selektionen aus den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson (I+J) nur ein Antikörperfragment isoliert werden konnte,

welches eine VEEV-spezifische Bindung aufwies, wurden verschiedene Strategien zur Generierung virusspezifischer Binder entwickelt. In den einzelnen Selektionen, die in Tab. 3.1 aufgelistet sind, wurde die Art der Viruspräparation (VRS-konzentriert, Saccharosegradient-gereinigt oder Zellkulturüberstand) und die Art der Virusimmobilisierung in Mikrotiterplatten (Fangantikörper oder adsorptiv) variiert.

Tab. 3.1: Übersicht über die verschiedenen Selektionsstrategien

| Strategie | Ak-SN | VRS | 1/5-VRS | Ak-VRS | Saccharose |
|---|---|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| VEEV-TC83-Präparation für Positivselektion | Überstand infizierter Verozellen | VRS-konzentriert | VRS-konzentriert | VRS-konzentriert | VRS-konzentriert + Saccharosegradient |
| Immobilisierung in | Fang-Ak 1 Kavität | Adsorptiv 1 Kavität | Adsorptiv 5 Kavitäten | Fang-Ak 1 Kavität | Adsorptiv 1 Kavität |
| Präselektion | Fang-Ak + Überstand nicht infizierter Verozellen | Vero-VRS | Vero-VRS | Fang-Ak + Vero-VRS | Vero-VRS |
| Kompetition | Überstand nicht infizierter Verozellen | Vero-VRS | Vero-VRS | muriner Ak + Vero-VRS | Vero-VRS |

Um nicht erneut Binder gegen wirtszelleigene Protein- oder Medienbestandteile anzureichern, wurden die Strategien hinsichtlich der Selektivität der Anreicherung optimiert. Alle Strategien beinhalteten eine Präselektion auf nicht Virus-haltigem Zellkulturmaterial, als auch eine Kompetition mit diesem Material während der Positivselektion. Exemplarisch ist in Abb. 3.5 der Verlauf der Selektion auf mittels Fangantikörpern immobilisiertem VRS-konzentriertem VEEV-TC83 (*Ak-VRS*) mit den Arbeitsschritten dargestellt. Bei den Strategien *Ak-VRS* und *Ak-SN* wurden die Fangantikörper in die Präselektionen integriert und kompetitiv ein nicht VEEV-spezifischer, muriner Antikörper während der Positivselektion auf Virus hinzugegeben. Für die Strategie *1/5-VRS* wurde die Fläche zur Virusimmobilisierung um Faktor fünf vergrößert, währenddessen alle anderen Parameter konstant gehalten wurden.

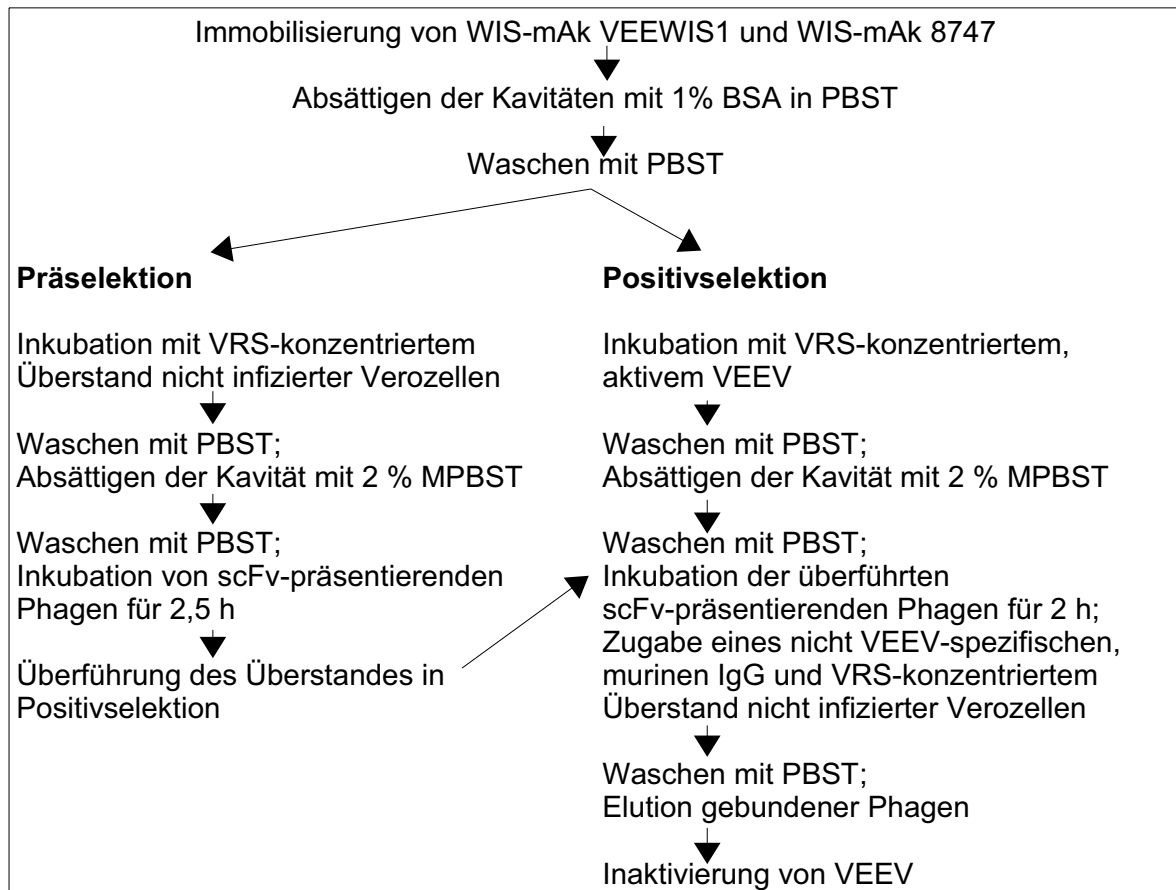


Abb. 3.5: Schematischer Ablauf einer Selektionsrunde der Strategie Ak-VRS

3.2.2 Selektionen VEEV-spezifischer Antikörperfragmente

Für diese Selektionen auf aktivem Virusantigen wurde die naive Antikörpergenbibliothek HAL4/7 mit einer im Vergleich zu den vorherigen Bibliotheken gesteigerten Komplexität von $5 \cdot 10^9$ scFv-Genen verwendet (Hust *et al.*, 2007b). Die Teilbibliothek HAL4 beinhaltet Gene für scFv mit Kappa-Ketten, während die Teilbibliothek HAL7, Gene für scFv mit Lambda-Ketten enthält. Es wurden in jeder Selektion 10^{12} cfu mittels Hyperphage verpackte scFv-präsentierende Phagen der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 verwendet. Da nach zwei Selektionsrunden die Diversität der Phagenpopulationen bereits stark reduziert war, konnte die Stringenz der Präselektion und der Konkurrenz, ohne die Gefahr einen affinen Binder zu verlieren, verstärkt werden. Hierfür wurde in der dritten Selektionsrunde die Anzahl eingesetzter Phagen reduziert, die Menge an eingesetztem Negativmaterial und die Fläche für die Präselektion erhöht. Zur Spezifitätsbestimmung der angereicherten, scFv-präsentierenden Phagen wurde ein Antigen-ELISA mit den polyklonalen Phagengemischen aus jeder Selektionsrunde durchgeführt (Abb. 3.6 und

Abb. 3.7). Bei den Selektionen *Ak-VRS* und *Ak-SN*, bei denen mittels IgG immobilisiertes VEEV-TC83 verwendet worden war, wurde als Kontrolle die Bindung an Zellkulturmaterial nicht infizierter Verozellen (Vero-VRS und Vero-SN) und an die verwendeten Fangantikörper analysiert (Abb.3.6).

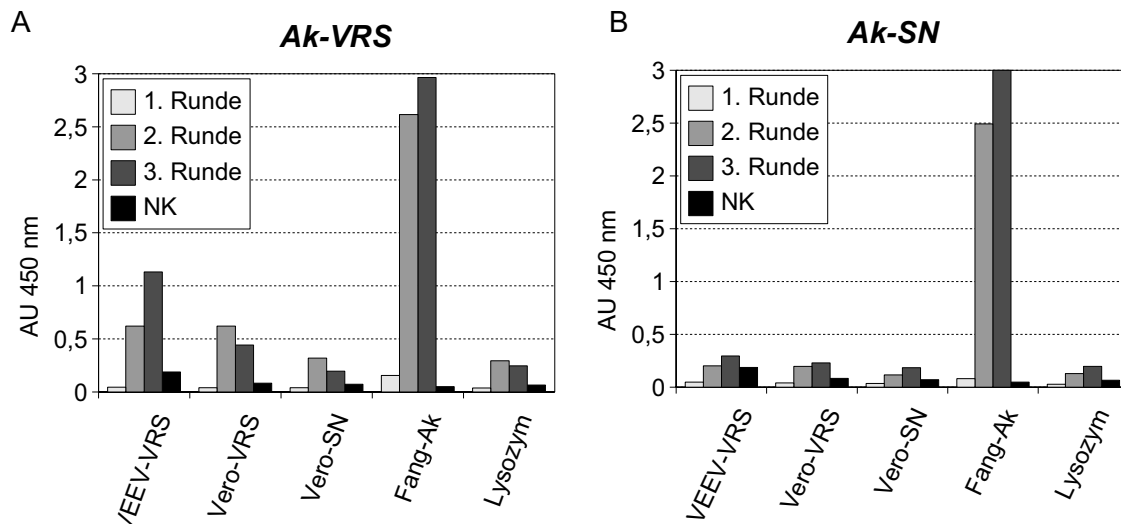


Abb. 3.6: Antigen-ELISA polyklonaler Phagen der Strategien *Ak-VRS* (A) und *Ak-SN* (B) 1 µg Lysozym, Fang-Ak, VEEV-TC83-VRS, Vero-VRS und Zellkulturüberstand, ½ verdünnt, wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin und das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis erfolgte mit 10^{10} cfu eingesetzten Phagen pro Kavität, mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB. Bei der Negativkontrolle (NK) wurden M13K07-Phagen eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen im ELISA.

Bei den Selektionen *Ak-VRS* und *Ak-SN* wurden Phagen, die Fangantikörper erkannten, trotz durchgeführter Präselektion und Konkurrenz am meisten angereichert. Da das Zellkulturmaterial für diesen ELISA adsorptiv und nicht über Fangantikörper immobilisiert wurde, hatte die unerwünschte Anreicherung von Fangantikörper-spezifischen Phagen keinen Einfluss auf die Signalintensität der Bindung an VEEV-TC83 und die Kontrollen mit Zellkulturmaterial nicht infizierter Verozellen. Nur bei der Selektion *Ak-VRS* wurden in der 3. Runde virusspezifische Binder deutlich angereichert, was anhand des höheren ELISA-Signals auf VRS-konzentriertem VEEV-TC83 als auf VRS-konzentriertem Überstand nicht infizierter Verozellen ersichtlich war. Bei der Selektionsstrategie *Ak-SN* wurden trotz der Konzentrierung von Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand durch Fangantikörper keine VEEV-spezifischen Phagen angereichert.

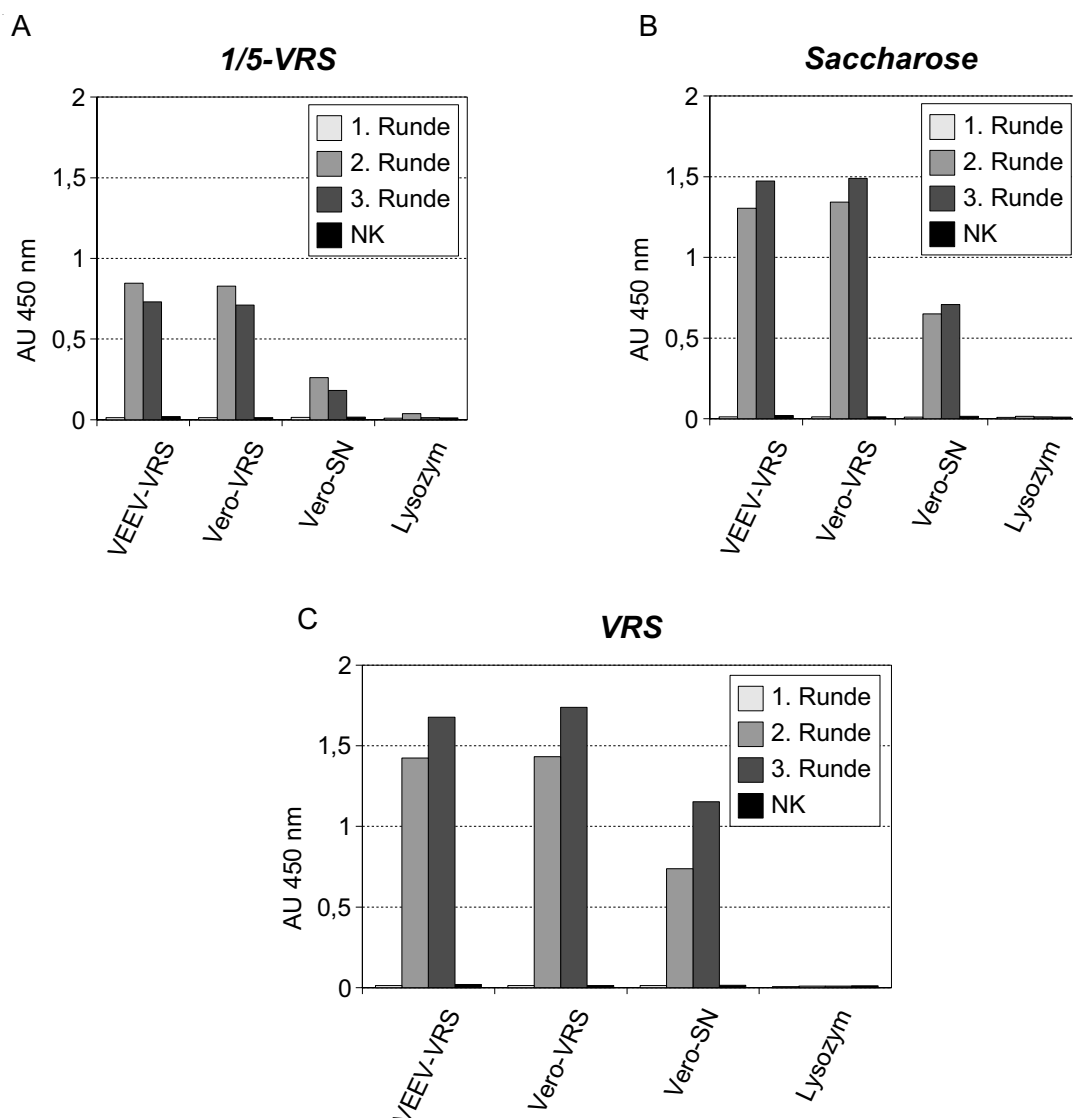


Abb. 3.7: Antigen-ELISA polyklonaler Phagen der Strategien 1/5-VRS (A), Saccharose (B) und VRS (C)

1 μ g Lysozym, VEEV-TC83-VRS, Vero-VRS und Zellkulturüberstand, $\frac{1}{2}$ verdünnt, wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin und das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis erfolgte mit 10^{10} cfu eingesetzten Phagen pro Kavität, mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB. Bei der Negativkontrolle (NK) wurden M13K07-Phagen eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen im ELISA.

In allen Selektionen mit adsorptiv immobilisiertem Virusmaterial banden die angereicherten scFv-präsentierenden Phagen vergleichbar an Zellkulturmaterial mit und ohne Viren. Trotz durchgeführter Präselektion und Konkurrenz konnte hierbei die Anreicherung von scFv-präsentierenden Phagen, die Zellkulturmaterial nicht infizierter Verozellen erkennen, nicht verhindert werden.

3.2.3 Analyse von Einzelklonen

Aus allen Selektionen wurden Einzelklone aus der 3. Runde hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an VEEV-TC83 untersucht. Insgesamt wurde die Spezifität von 230 Klonen der Selektion *Ak-VRS*, von 92 der Selektion *Saccharose* und von jeweils 46 Klonen der restlichen Selektionen analysiert. Die Phagemide der Antikörpergenbibliothek HAL4/7 beinhalten ein hinter dem scFv-Gen liegendes Amber-Stoppkodon, das eine direkte Produktion löslicher scFv ohne vorherige Umklonierung ermöglicht. Nach der Produktion wurde die Bindung der monoklonalen scFv an VRS-konzentrierten Überstand, sowohl mit als auch ohne VEEV-TC83, überprüft. Von den produzierten Antikörperfragmenten banden 43 spezifisch an VEEV-TC83. Diese 43 scFv zeigten keine Bindung an VRS-konzentrierten Überstand nicht infizierter Verozellen. Trotz Optimierung der Selektion erkannten 22 der 230 untersuchten Antikörperfragmente VRS-konzentrierten Zellkulturüberstand ohne Viren. Dies kann durch eine spezifische Bindung an wirtszelleigene Proteine oder Medienbestandteile, oder aber eine unspezifische Bindung der Antikörperfragmente erklärt werden. Um die Diversität der erhaltenen Binder abzuschätzen, wurden die scFv-Gene der im monoklonalen ELISA positiv getesteten Antikörperfragmente, durch PCR mit den Oligonukleotiden MH-LaczPro_f und MH-gIII_r amplifiziert und nachfolgend mit der Restriktionsendonuklease *Bst* NI behandelt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abb. 3.8). Die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Bst* NI ist polymorph innerhalb von Immunglobulingenen verteilt und ermöglicht so die Unterscheidung verschiedener Antikörpersequenzen anhand des entstandenen Bandenmusters (Marks *et al.*, 1991).

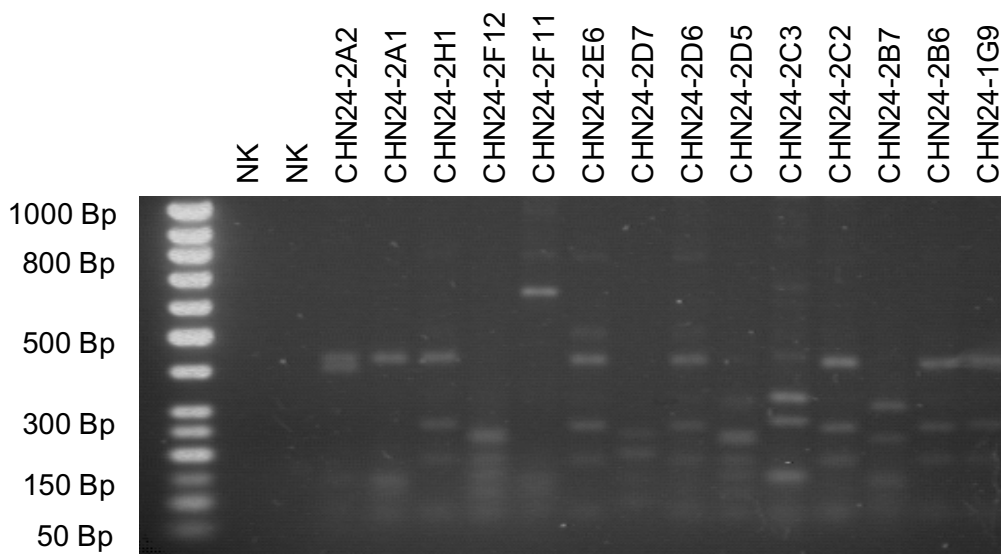


Abb. 3.8: *Bst* NI-geschnittene scFv-Gene nach elektrophoretischer Auftrennung
Amplifizierte DNA-Fragmente wurden bei 60 °C für 3 h mit *BST* NI geschnitten, bevor sie in einem 2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt wurden. Die Anfärbung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid.

Insgesamt wurden 16 verschiedene Restriktionsmuster ermittelt. Traten Restriktionsmuster mehrfach auf, so wurde jeweils die DNA von zwei Klonen sequenziert. In der Regel waren Klone mit vergleichbarem Restriktionsmuster in der DNA-Sequenz identisch. Insgesamt wurden elf verschiedene scFv-Klone aus den fünf Selektionsstrategien isoliert. Alle VEEV-spezifischen Binder bis auf MK271-G2 wurden mittels der Strategie *Ak-VRS* selektiert. Ausgehend von den Selektionsstrategien *Saccharose* und *1/5-VRS* wurden jeweils die Klone MK271-G2 und CHN24-2C2 isoliert. Mit den Strategien *VRS* und *Ak-SN* konnten keine VEEV-spezifischen Binder selektiert werden. Alle isolierten VEEV-spezifischen Antikörperfragmente beinhalteten leichte Ketten des Typs Lambda. Diese gehörten zu den Subfamilien LV1, LV2, LV3 und LV6, wobei die Subfamilie LV3 am häufigsten auftrat (Tab.3.2). Zudem beinhalteten die isolierten Antikörperfragmente schwere Ketten der Subfamilien HV1, HV3 und HV4. Hierbei dominierten Antikörperfragmente mit einer schweren Kette der Subfamilie HV1 (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Keimbahnlinien der VEEV-spezifischen scFv-Gene der Antikörpergenbibliothek HAL4/7

Die Abkürzung inv zeigt die Beteiligung eines inversen Gensegments an.

| Klon | VH | | | VL | |
|-------------|-------------|--------------|----------|-------------|----------|
| | HV | HD | HJ | LV | LJ |
| CHN24-2-A1 | IGHV1-69*01 | IGHD2-8*02 | IGHJ5*02 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*02 |
| CHN24-2-A2 | IGHV3-9*01 | IGHD6-19*01 | IGHJ3*02 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| CHN24-2-C2 | IGHV1-69*01 | IGHD7-27*01i | IGHJ3*02 | IGLV3-21*01 | IGLJ3*01 |
| CHN24-2-C3 | IGHV3-23*01 | IGHD6-13*01 | IGHJ6*03 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| CHN24-2-B7 | IGHV1-18*01 | IGHD2-21*02 | IGHJ3*02 | IGLV2-14*04 | IGLJ3*01 |
| CHN24-2-D5 | IGHV1-8*01 | IGHD3-3*01i | IGHJ6*02 | IGLV2-14*04 | IGLJ3*02 |
| CHN24-2-F11 | IGHV1-18*01 | IGHD6-6*01 | IGHJ4*02 | IGLV6-57*01 | IGLJ3*02 |
| MK269-C10 | IGHV3-30*04 | IGHD5-24*01i | IGHJ6*02 | IGLV2-14*02 | IGLJ1*01 |
| MK269-E11 | IGHV4-34*01 | IGHD3-3*01 | IGHJ4*02 | IGLV1-51*02 | IGLJ3*01 |
| MK269-E12 | IGHV4-4*02 | IGHD2-21*01i | IGHJ6*02 | IGLV3-21*02 | IGLJ3*01 |
| MK271-G2 | IGHV1-69*01 | IGHD7-27*01 | IGHJ6*02 | IGLV3-21*02 | IGLJ3*02 |

3.3 Charakterisierung der selektierten VEEV-spezifischen Antikörperfragmente

3.3.1 Produktion von monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen VEEV-spezifischer Klone

In der weiteren Analyse wurden die isolierten VEEV-spezifischen Klone aus den Antikörpergenbibliotheken HAL4/7 und Heidelberg berücksichtigt. Monoklonale, scFv-präsentierende Phagen dieser Antikörperfragmente wurden mithilfe des Helferphagen M13K07 produziert. Als Negativkontrolle für die weiteren Analysen wurden ebenfalls scFv-präsentierende Phagen des Antikörperfragments IIB6 hergestellt. Nach zwei unabhängigen Produktionen wurden die Titer infektiöser Phagen bestimmt (Titer siehe Anhang). Um jedoch die verschiedenen Phagenproduktionen in der weiteren Analyse vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Präsentation der Antikörperfragmente anhand einer Immunfärbung überprüft. Hierzu wurden die Phagenproteine der generierten Phagen denaturiert und über eine Gelelektrophorese ihrer apparenten Größe entsprechend aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Immunfärbung des Phagenproteins pIII der Anteil an scFv-pIII-Fusionsprotein auf der Phagenoberfläche im Vergleich zu pIII bestimmt (Abb. 3.9).

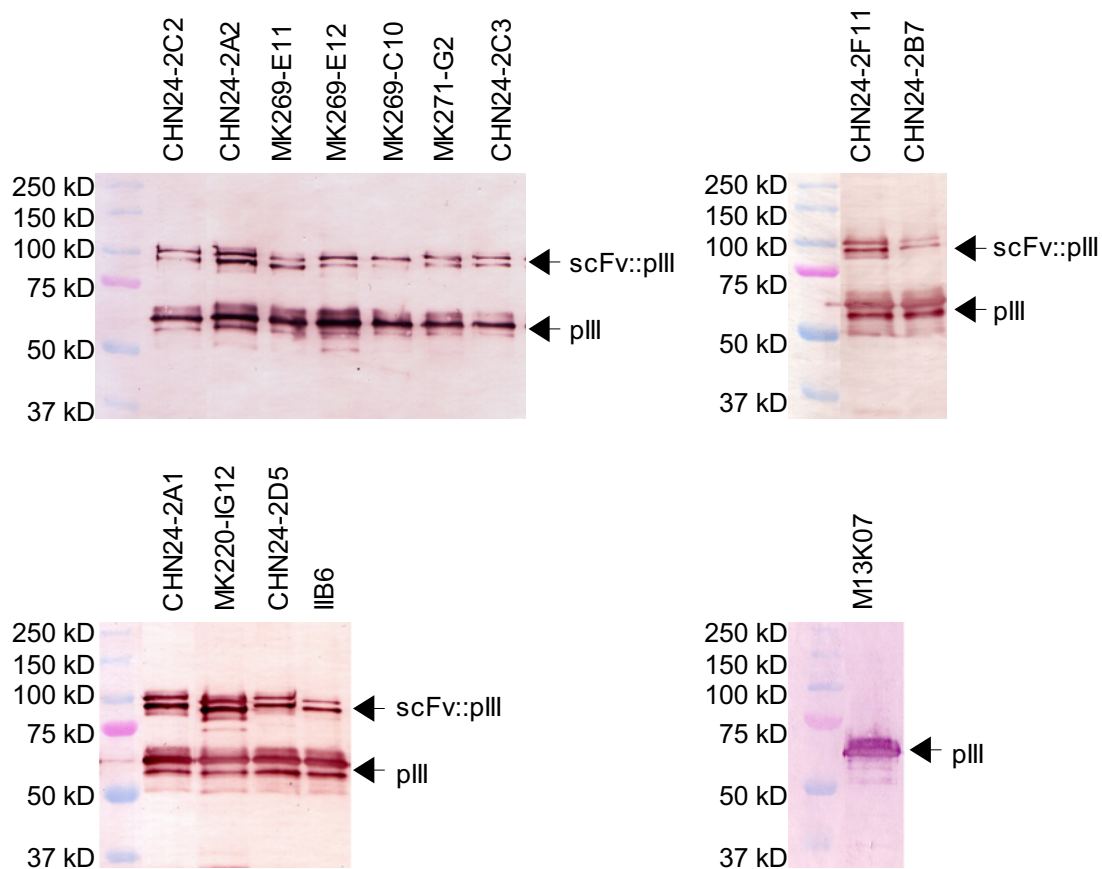


Abb. 3.9: Immunfärbung des Phagenproteins pIII der monoklonalen Phagen
10 % SDS-Gel nach der Auftrennung von 10^{10} scFv-präsentierenden, vollständig denaturierten Phagen (Denaturierung 95 °C, red.) Nach erfolgtem Western Blot wurde die Membran mit 2 % MPBST geblockt. Danach folgte die Detektion mittels des Ak Anti-pIII (1:1000) und des Ak Anti-Maus-IgG-Fc-AP (1:5000). Die Entwicklung erfolgte mit NBT/BCIP.

Obwohl das Phagenprotein pIII eine theoretische Molekularmasse von 42,5 kD besitzt, wurde es bei der Immunfärbung bei einer apparenten Molekularmasse von ungefähr 60 kD detektiert. Dies entspricht den Beobachtungen von Goldsmith und Konigsberg (1977) und Breitling *et al.* (1991). Das scFv-pIII-Fusionsprotein mit einer theoretischen Molekularmasse von ungefähr 70 kD wurde bei ungefähr 95 kD in Form einer Doppelbande detektiert. Alle Antikörperfragmente wurden auf der Phagenoberfläche präsentiert und konnten in die weitere Analyse eingesetzt werden.

3.3.2 Antigen-ELISA mit VRS-konzentriertem VEEV-TC83

Die monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen wurde mittels Antigen-ELISA hinsichtlich der Erkennung von adsorptiv immobilisiertem, VRS-konzentriertem

Überstand mit und ohne VEEV-TC83 untersucht (Abb. 3.10). Hierzu wurden jeweils 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen der einzelnen Produktionen eingesetzt, von denen die gebundenen Phagen mittels des Antikörpers Anti-M13-POD nachgewiesen wurden.

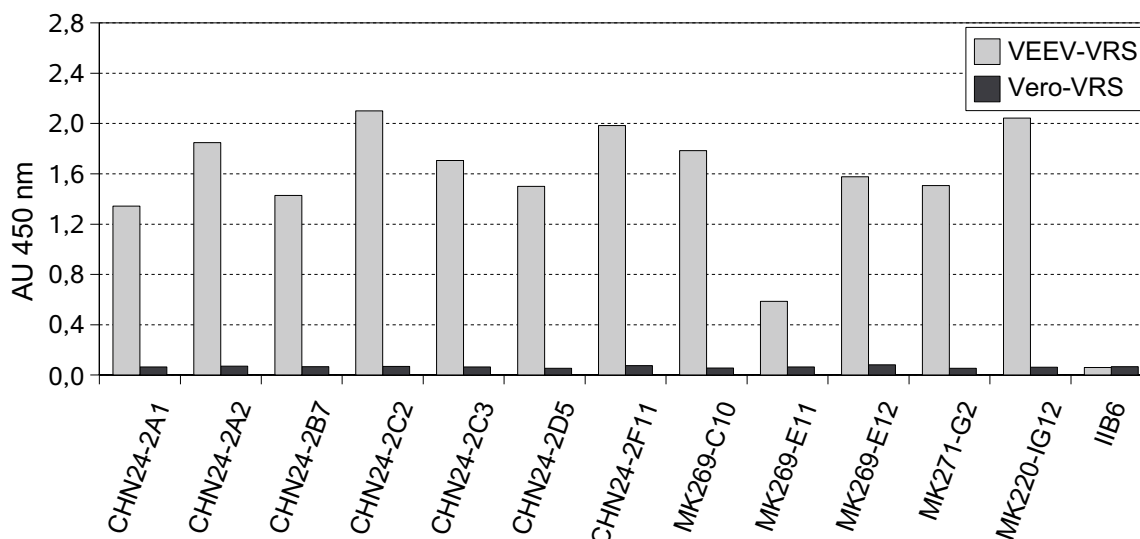


Abb. 3.10: Antigen-ELISA monoklonaler Phagen auf adsorptiv immobilisiertem, VRS-konzentriertem VEEV-TC83

1 µg VEEV-TC83-VRS und Vero-VRS wurden adsorptiv immobilisiert. Nach dem Absättigen mit 2 % MPBST wurden jeweils 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen pro Kavität inkubiert. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB. Dargestellt sind die aus zwei unabhängigen Phagenproduktionen gebildeten Mittelwerte.

Mit allen VEEV-spezifischen Phagen konnte VRS-konzentriertes, aktives VEEV-TC83 nachgewiesen werden. Dagegen wurde VRS-konzentrierter Überstand nicht infizierter Verozellen von keinem Phagen erkannt. Analog wurde ein Antigen-ELISA mit Formalin-inaktiviertem VEEV-TC83 durchgeführt. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse des Experimentes mit aktivem Virusantigen, d. h. Formalin-inaktiviertes VEEV-TC83 konnte mit allen VEEV-spezifischen Phagen detektiert werden (Daten siehe Anhang).

3.3.3 Nachweis von VEEV-Proteinen im Lysat infizierter Verozellen

Des Weiteren wurde die Erkennung von VEEV-Proteinen im Lysat infizierter Zellen durch die monoklonalen, scFv-präsentierenden Phagen untersucht. Für die Lysatherstellung wurden Verozellen mittels Harnstoff und Scherkräften aufgeschlossen. Nachdem das Zelllysate infizierter und nicht infizierter Verozellen adsorptiv immobilisiert wurde, erfolgte die Durchführung analog zu dem in 3.3.2 beschriebenen Antigen-ELISA.

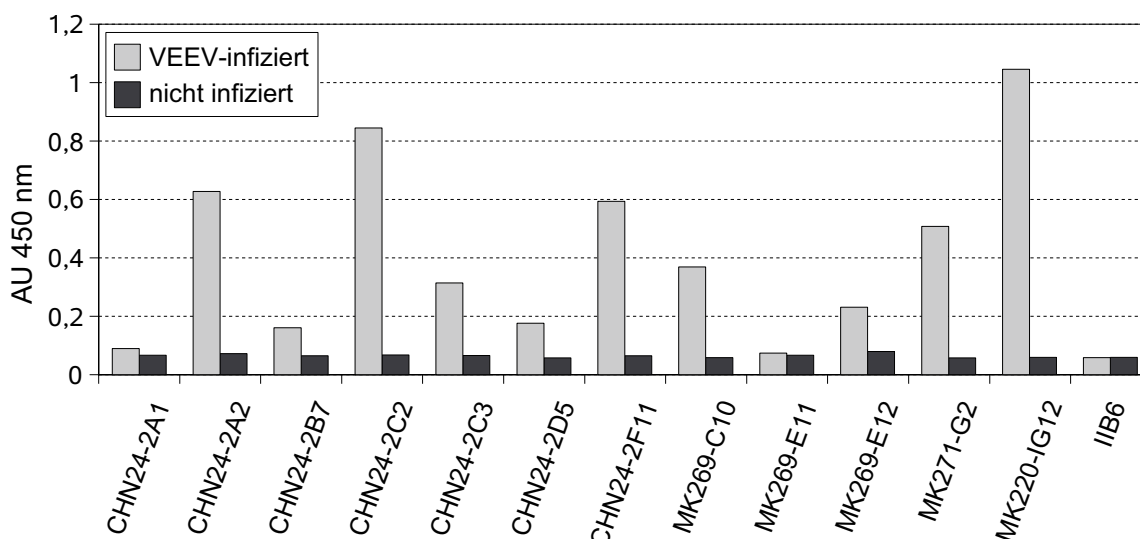


Abb. 3.11: Detektion von VEEV-TC83 im Zelllysat infizierter Verozellen

Zelllysat von VEEV-TC83-infizierten und nicht infizierten Verozellen wurde adsorptiv immobilisiert. Nach dem Absättigen mit 2 % MPBST wurden jeweils 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen pro Kavität inkubiert. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB. Dargestellt sind die aus zwei unabhängigen Phagenproduktionen gebildeten Mittelwerte.

VEEV-Proteine im Lysat infizierter Verozellen konnten mit allen VEEV-spezifischen Phagen, außer denen der Klone CHN24-2A1 und MK269-E11, nachgewiesen werden. Mit den Phagen der Klone CHN24-2B7, CHN24-2D5 und MK269-E12 konnten VEEV-Proteine im Zelllysat nur in geringem Umfang detektiert werden.

3.3.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität der isolierten Antikörperfragmente

Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität der isolierten Antikörperfragmente wurden wichtige Vertreter verschiedener serologischer Gruppen der Alphaviren verwendet (Tab. 3.3). Dazu wurden drei verschiedene VEEV-Stämme, sowie je ein Vertreter der Art WEEV, EEEV und CHIKV im Sandwich-ELISA eingesetzt.

Tab. 3.3: Für die Bestimmung der Kreuzreaktionen verwendete Viren mit entsprechender Virusmenge, nach KID_{50} bestimmt

| Stamm | VEEV-TC83 | VEEV-H12/93 | VEEV-230 | WEEV | EEEV | CHIKV |
|------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| KID_{50} | $4 \cdot 10^8$ | $2,6 \cdot 10^8$ | $1 \cdot 10^9$ | $2,6 \cdot 10^5$ | $8 \cdot 10^8$ | $1,4 \cdot 10^6$ |

Zuerst wurden hierbei die Alphaviren über einen Antikörper-Mix spezifisch angereichert.

Zur Immobilisierung von VEEV-Antigen wurde der Fangantikörper VEEWIS1 verwendet. Die aus Zellkulturüberstand gebundenen Viren wurden jeweils mit 10^9 cfu scFv-präsentierenden Phagen und anschließend dem Antikörper Anti-M13-POD nachgewiesen (Abb. 3.12).

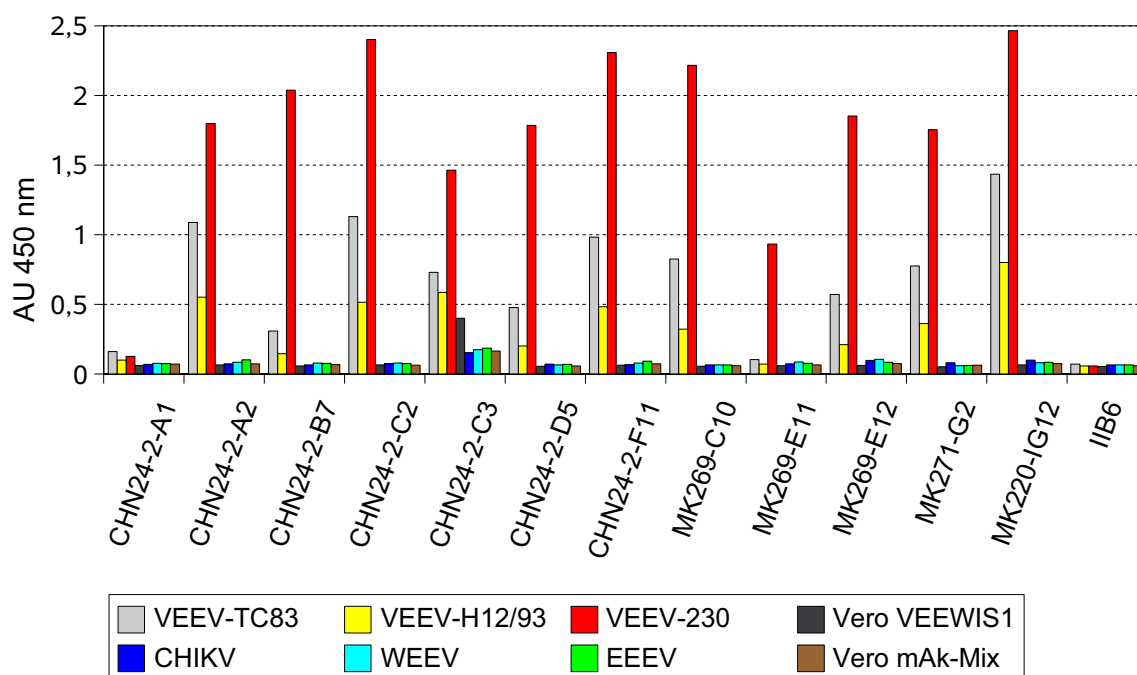


Abb. 3.12: Bestimmung der Kreuzreaktionen der VEEV-spezifischen Phagen

Im Falle von VEEV-Stämmen wurde der WIS-mAk VEEWIS1 und im Falle der anderen Alphaviren ein Mix aus WIS-mAk 3/4, 12/2 und VEEWIS1 immobilisiert. Nach Inkubation mit den entsprechenden Alphaviren erfolgte das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis erfolgte mit 10^9 cfu scFv-präsentierenden Phagen, dem Antikörper Anti-M13-POD (1:5000) und mit TMB. Dargestellt sind die aus zwei unabhängigen Phagenproduktionen gebildeten Mittelwerte.

Zusätzlich wurde für den Nachweis der VEEV-Stämme der biotinylierte Antikörper 8/6 und für den Nachweis der anderen Arten der Alphaviren ein biotinylierter Mix aus den Antikörpern 8/6, 12/2 und 42/2 verwendet. Diese biotinylierten Antikörper wurden anschließend mit Streptavidin-POD detektiert (Abb. 3.13).

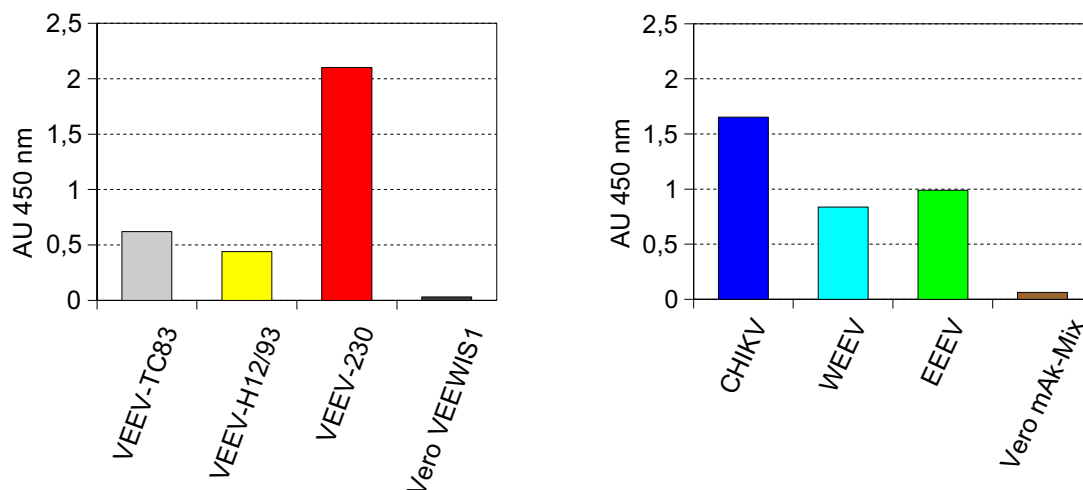


Abb. 3.13: Nachweis der in der Kreuzreaktivitätsbestimmung eingesetzten Viren
Im Falle von VEEV-Stämmen wurde Ak VEEWIS1 und im Falle der anderen Alphaviren ein Mix aus WIS-mAk 3/4, 12/2 und VEEWIS1 immobilisiert. Nach Inkubation mit den entsprechenden Alphaviren erfolgte das Absättigen mit 2 % MPBST. Der Nachweis von VEEV-Stämmen wurde mit dem WIS-mAk 8/6 und von den anderen Alphaviren mit einem Mix aus den biotinylierten WIS-mAk 8/6, 12/2 und 42/2. Die Entwicklung erfolgte über Streptavidin-POD (1:4000) mit TMB.

Eingesetzt als Detektionsantikörper erkannten die virusspezifischen Phagen ausschließlich VEEV-Stämme und zeigten keine Kreuzreaktionen mit anderen Alphaviren. Die unterschiedlichen VEEV-Antigene wurden durch alle scFv-präsentierenden Phagen nachgewiesen, mit Ausnahme der Antikörperfragmente CHN24-2A1, CHN24-2B7 und MK269-E11. Das Antikörperfragment CHN24-2C3 zeigte eine Bindung an den Fangantikörper VEEWIS1. Bis auf die erwähnten Phagenpräparationen zeigten alle ein ähnliches Verhältnis zwischen den Signalintensitäten auf Basis der verschiedenen VEEV-Stämme. Dieses Verhältnis der Signalintensitäten wurde jedoch auch bei der Positivkontrolle der Bundeswehr erreicht. Die Detektion des Stammes VEEV-230 führte dabei zu den höchsten ELISA-Signalen. Im Gegensatz zu den übrigen viralen Antigenen war VEEV-230 chemisch inaktiviert. Mittels der Positivkontrollen konnten alle Vertreter der Alphaviren nachgewiesen werden (Abb. 3.13).

3.3.5 Immunhistochemische Färbung VEEV-infizierter Verozellen

Für die immunhistochemische Färbung VEEV-infizierter Verozellen durch die monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen wurden nicht infizierte und VEEV-TC83-infizierte Verozellen in einer Mikrotiterplatte kultiviert. Nach dem Absättigen der Oberfläche wurden 10^{10} cfu scFv-präsentierende Phagen je Kavität eingesetzt. Die

an die Zelloberflächen gebundenen Phagen wurden mithilfe des Antikörpers Anti-M13-POD und dem Substrat AEC detektiert. Nach einer Entwicklungszeit von 30 Minuten wurden die Färbungen lichtmikroskopisch beurteilt (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Auswertung der Zellfärbung mit scFv-präsentierenden Phagen

| Klon/ Antikörperfragment | VEEV- infiziert | nicht infiziert | Klon/ Antikörperfragment | VEEV- infiziert | nicht infiziert |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| CHN24-2A1 | — | — | CHN24-2F11 | + | — |
| CHN24-2A2 | + | — | MK269-C10 | + | — |
| CHN24-2B7 | + | — | MK269-E11 | + | — |
| CHN24-2C2 | + | — | MK269-E12 | + | — |
| CHN24-2C3 | + | — | MK271-G2 | + | — |
| CHN24-2D5 | + | — | MK220-IG12 | + | — |
| WIS-mAk 8/6 | + | — | IIB6 | — | — |

Bis auf die Phagenpräparation des Klons CHN24-2A1 waren alle VEEV-spezifischen Phagen in der Lage infizierte Verozellen anzufärben. Die lokal auftretende Färbung erschien bei allen Klonen körnig. Die Färbung VEEV-infizierter Verozellen durch scFv-präsentierende Phagen des Klons MK220-IG12 ist exemplarisch in Abb. 3.14 dargestellt. Nicht infizierte Verozellen zeigten nach Inkubation mit den entsprechenden Phagenpräparationen keine Färbung (Daten nicht gezeigt). Die Negativkontrolle, d. h. VEEV-infizierte Verozellen inkubiert mit IIB6-präsentierenden Phagen, wies ebenfalls keine Färbung auf (Abb. 3.14).

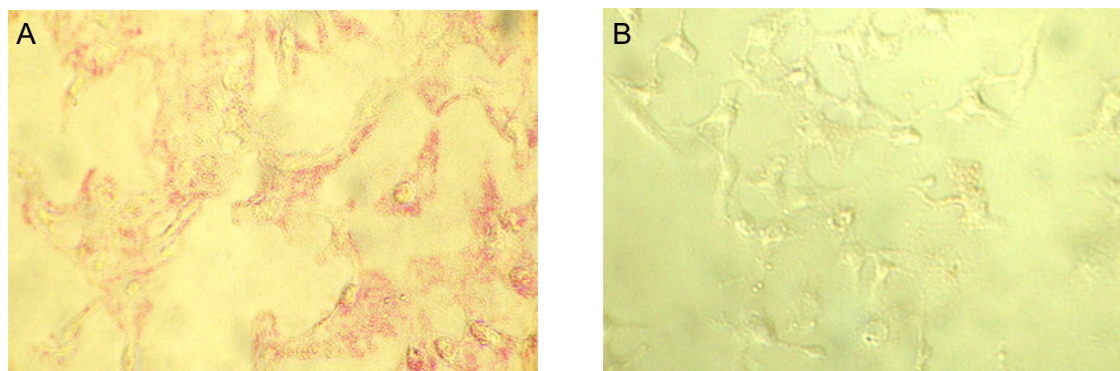


Abb. 3.14: Färbung infizierter Verozellen durch die scFv MK220-IG12 (A) und IIB6 (B)
In einer Kavität wurden $6 \cdot 10^3$ Zellen mit VEEV-TC83 infiziert, nach 24 h mit Formalin fixiert. Nach dem Absättigen mit 2 % MPBST erfolgte der Nachweis mit 10^{10} cfu scFv-präsentierenden Phagen, dem Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat AEC. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung.

3.3.6 Immunfärbung von Virusproteinen

Für die Analyse, ob sich die isolierten Binder eignen virale Proteine mittels

Immunfärbung nachzuweisen, wurde VRS-konzentriertes VEEV-TC83 für 20 Minuten in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer auf 56 °C erhitzt. Nach erfolgter Auftrennung der Viruspräparation mittels SDS-PAGE wurden die separierten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Für die Immunfärbung viraler Proteine wurden je $5 \cdot 10^{10}$ cfu scFv-präsentierenden Phagen zur Detektion von 5 µg Protein der Viruspräparation eingesetzt. Der Nachweis gebundener Phagen erfolgte mit dem Antikörper Anti-M13-POD und dem Substrat DAB.

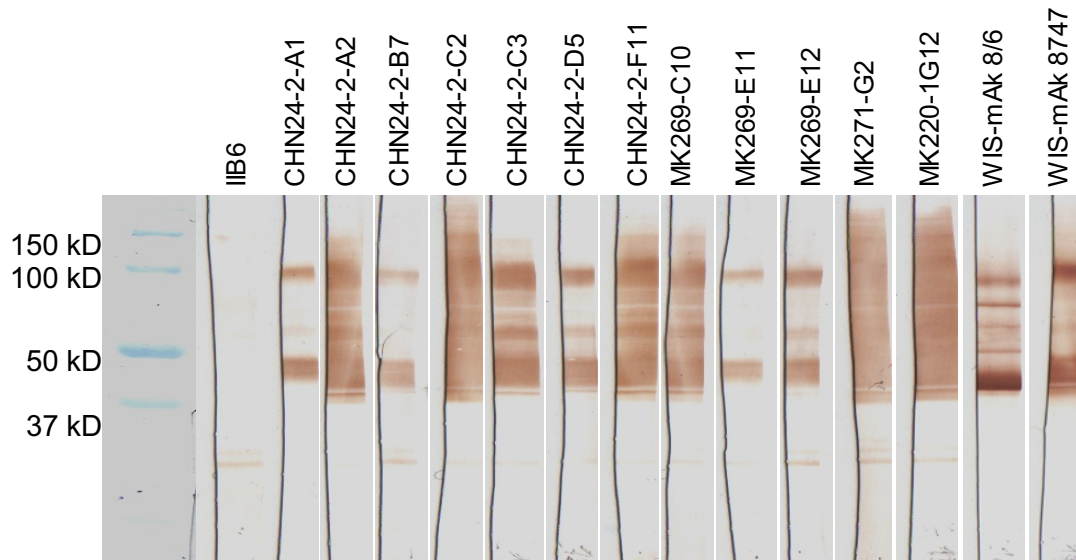


Abb. 3.15: Immunfärbung von VEEV-Proteinen mit scFv-präsentierenden Phagen
VEEV-TC83-VRS-Material wurde 20 Minuten auf 56 °C in nicht reduzierendem Laemmli-Puffer erhitzt. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese in einem 10 % PAA-Gel und anschließendem Western Blot wurde die Membran 15 min mit 2 % PBST abgesättigt. Membranstreifen (5 µg Protein) wurden mit $5 \cdot 10^{10}$ cfu scFv-präsentierenden Phagen oder 1 µg/mL WIS-mAk inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit dem Antikörper Anti-M13-POD (1:4000) im Falle der WIS-Ak mit dem Ak Anti-Maus-IgG-Fc-POD (1:10000). Die Färbung erfolgte mit DAB.

Durch die Phagenpräparationen wurden unterschiedliche Proteinbanden detektiert. Einige Antikörperfragmente, z. B. CHN24-2C2, MK271-G2 und MK220-1G12, führten zur Anfärbung von Proteinen im Bereich apparenter Molekülmassen von ca. 40 bis größer 150 kD. Durch weitere isolierte Antikörperfragmente, z. B. CHN24-2B7, CHN24-2D5 und MK269-E11, wurden Proteine mit definierten apparenten Molekülmassen von ca. 50 kD und 100 kD detektiert. Analog behandelte Proteine aus VRS-konzentriertem Überstand nicht infizierter Verozellen wurden durch alle Phagenpräparationen nicht erkannt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnten vollständig denaturierte VEEV-Proteine (5 Minuten, reduzierender Laemmli-Puffer, 95 °C) durch die scFv-präsentierenden Phagen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen die spezifische Erkennung struktureller Epitope durch die monoklonalen, VEEV-spezifischen Phagen vermuten.

3.3.7 Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen

Um die generierten VEEV-spezifischen Antikörperfragmente als Detektions- und Fangantikörper nutzen zu können, wurden von diesen scFv-Fc-Fusionsproteine erzeugt. Die Klonierung erfolgte analog zur Klonierung des Gens des scFv MK220-IG12 in den Vektor pCMV-hlgG1-Fc-XP. Nach anschließender Transfektion von HEK293T-Zellen mit diesen Konstrukten wurden die Konzentrationen der scFv-Fc-Fusionsproteine in den Zellkulturüberständen durch einen *Human-Capture-ELISA* bestimmt. Die zwei scFv-Fc-Fusionsproteine, basierend auf den Klonen CHN24-2F11 und CHN24-2D5, konnten nur in sehr geringen Mengen detektiert werden (250 ng/mL bzw 1 µg/mL), während die Fusionsproteine der anderen Antikörperfragmente in Konzentrationen zwischen 4 und 10 µg/mL im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnten.

3.3.8 Nachweis von VRS-konzentriertem VEEV-TC83 mit scFv-Fc-Fusionsproteinen

Um die Funktionalität der erzeugten scFv-Fc-Fusionsproteine zu prüfen, wurde ein Antigen-ELISA mit VRS-konzentriertem Überstand mit und ohne VEEV-TC83 durchgeführt (Abb. 3.16). Zur Detektion wurden ca. 10 ng der Fusionsproteine eingesetzt, die mithilfe des Antikörpers Anti-Human-IgG-γ-Kette-POD nachgewiesen wurden.

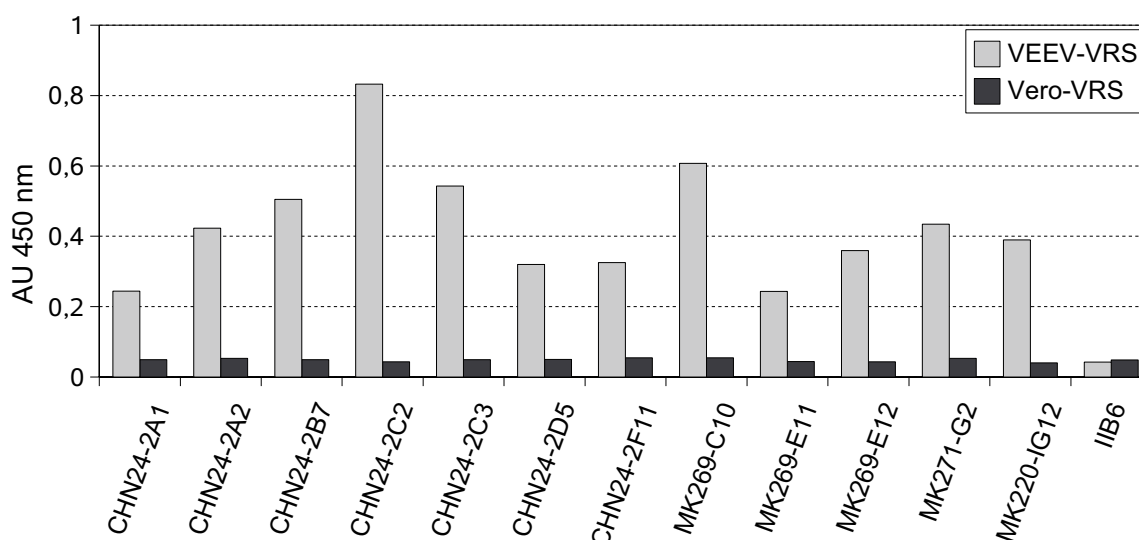


Abb. 3.16: Monoklonaler Antigen-ELISA auf adsorptiv immobilisiertem, aktivem, VRS-konzentriertem VEEV-TC83 mit scFv-Fc-Fusionsproteinen
1 µg VEEV-TC83-VRS und Vero-VRS wurden adsorptiv immobilisiert. Nach dem Absättigen mit 2 % MPBST erfolgte der Nachweis von VEEV-Proteinen mit ca. 10 ng scFv-Fc-Fusionsprotein pro Kavität, dem Ak Anti-Human-IgG-γ-Kette-POD (1:10000) und mit dem Substrat TMB.

Mit allen VEEV-spezifischen scFv-Fc-Fusionsproteinen konnte adsorptiv immobilisiertes, aktives VEEV-TC83 nachgewiesen werden.

3.3.9 Immunfärbung von Virusprotein mit den generierten scFv-Fc-Fusionsproteinen

Um die Ergebnisse der Immunfärbung von VEEV-Proteinen durch die scFv-präsentierenden Phagen zu bestätigen, wurde dieser Versuch mit den erzeugten scFv-Fc-Fusionsproteinen wiederholt. VRS-konzentriertes VEEV-TC83 wurde hierfür sowohl unvollständig (20 Minuten, nicht reduzierender Laemmli-puffer, 56 °C), als auch in einem zweiten Ansatz vollständig (5 Minuten, reduzierender Laemmli-puffer, 95°C) denaturiert. Nach erfolgter Elektrophorese und anschließendem Western Blot wurden die VEEV-Proteine jeweils mit 1 µg/mL scFv-Fc-Fusionsprotein eines Antikörperfragments inkubiert, bevor gebundene Fusionsproteine mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Fc-AP detektiert wurden. In Abb. 3.17 sind exemplarisch die Ergebnisse für drei Klone, sowie eine Silberfärbung der Proben nach der Elektrophorese dargestellt.

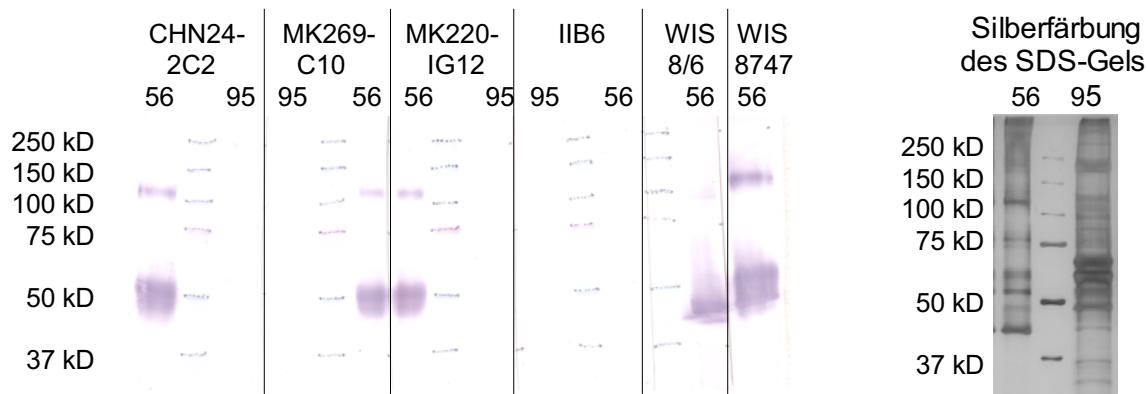


Abb. 3.17: Immunfärbung von VEEV-Proteinen mit scFv-Fc-Fusionsproteinen und entsprechende Silberfärbung

VEEV-TC83-VRS wurde für 20 min bei 56°C, nicht reduzierend, (in der Abbildung mit 56 bezeichnet) oder für 5 min bei 95°C, reduzierend, in Laemmli-puffer (in der Abbildung mit 95 bezeichnet) erhitzt. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese mit einem 10 % SDS-Gel und Western Blot wurde die Membran mit 2 % MPBST abgesättigt. Der Nachweis erfolgte mit 1 µg/mL scFv-Fc-Fusionsprotein oder WIS-mAk und mittels des Ak Anti-Human-IgG-Fc-AP (1:5000) und im Falle der WIS-mAk mittels des Ak Anti-Maus-IgG-Fc-AP (1:10000). Die Färbung erfolgte mit NBT/BCIP. Zum Vergleich wurden die Proteinproben nach Elektrophorese silbergefärbt.

Alle drei verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine erkannten Virusproteine mit apparenten Molekularmassen von ca. 50 kD und 100 kD, die vorher in nicht-reduzierendem Laemmli-puffer auf 56 °C erhitzt wurden. Diese Proteine wurden nicht detektiert, wenn das

Virusprotein vor der Elektrophorese in reduzierendem Lämmli-Puffer bei 95 °C inkubiert wurde. Die zur Positivkontrolle eingesetzten WIS-Antikörper 8/6 und 8747 detektieren laut Literatur nicht lineare Epitope des viralen E2-Glykoproteins.

3.4 Affinitätsreifung des Antikörperfragments MK220-IG12

3.4.1 Erstellung der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12- V_H

Zur Generierung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit verbesserter Affinität wurde auf Basis des Klon MK220-IG12 eine Antikörpergenbibliothek erstellt, die neben dem V_H -Gen des ursprünglichen Antikörperfragments das V_L -Genrepertoire der Antikörpergenbibliothek HAL7 beinhaltet. Dies entspricht einer Komplexität von $2,3 \cdot 10^8$ verschiedenen Genen für V_L der Subfamilien LV1-LV10 (persönliche Mitteilung Herr Hust, TU Braunschweig). Das V_H -Gen des Originalklons, MK220-IG12, wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden MH-yolNotI_r und MK-pelB_f amplifiziert, gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* geschnitten und in den Vektor pHAL14-VL der scFv-Bibliothek kloniert. Die Plasmide pHAL14-VL, die unterschiedlichen V_L -Gene in dem Phagen-Display-Vektor pHAL14 enthielten, waren bereits mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* geschnitten und mit dem Enzym CIP dephosphoryliert worden. Nach der Durchführung von vier Ligationen mit dieser Plasmid-DNA und dem präparierten PCR-Produkt wurden *E. coli* XL1-Blue-Zellen anschließend mit der ligierten DNA elektroporiert. Die vier generierten Teilbibliotheken enthielten zusammengefasst $1,2 \cdot 10^8$ unabhängige Klone. Mittels PCR mit den Oligonukleotiden MK-myc_r und MK-pelB_f wurden 47 Klone hinsichtlich der Insertion kompletter scFv-Gene untersucht. Auf Basis dieser ausgewählten Klone wurden 45 PCR-Produkte generiert, welche der Größe nach einer inserierten scFv-Genkassette entsprachen. Die Größe eines Amplifikats entsprach nur dem Gen einer variablen Domäne, und ein weiterer PCR-Ansatz führte zu keinem Amplifikat. Von den 45 PCR-Produkten wurden fünf mit dem Oligonukleotid MK-myc_r sequenziert. Diese fünf unterschiedlichen V_L -Gene gehörten zu den Subfamilien LV1 (2x), LV2 und LV6 (2x). Für den Einsatz der neu generierten Antikörpergenbibliothek wurden alle Teilbibliotheken getrennt mit den Helferphagen M13K07 und Hyperphage verpackt. Zur Beurteilung der verpackten Teilbibliotheken wurde der Anteil an in die Phagenhülle integriertem Fusionsprotein aus Antikörperfragment und pIII mittels Immunfärbung des

Phagenproteins pIII bestimmt.

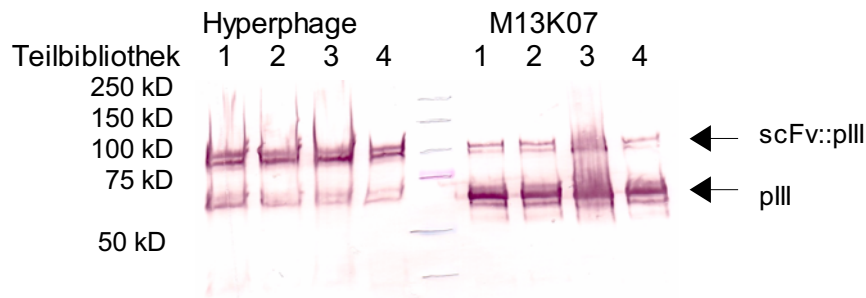


Abb. 3.18: Präsentation der Antikörperfragmente auf polyklonalen Phagen

Es wurden $5 \cdot 10^{10}$ cfu M13K07 oder $5 \cdot 10^9$ cfu Hyperphage verpackte, scFv-präsentierende Phagen vollständig denaturiert und über ein 12 % SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Der Nachweis erfolgte mittels des Ak Anti-pIII (1:2000) und mittels des Ak Anti-Maus-IgG-Fc-AP (1:10000). Die Färbung erfolgte mit NBT/ BCIP.

Die mit den Helferphagen M13K07 und Hyperphage generierten Phagen zeigten Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche. Im Falle des Helferphagen Hyperphage, der zu einer oligovalenten Präsentation von Antikörperfragmenten führt, lagen ca. 70 % des Phagenproteins pIII in Fusion mit einem scFv vor.

3.4.2 Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit ausgetauschter V_L

Für die Selektion von Phagen, die ein Antikörperfragment aus der V_H des Klons MK220-IG12 und einer neu selektierten V_L auf der Oberfläche präsentieren, wurden zwei Selektionsstrategien mit magnetischen Partikeln entwickelt. An diese Partikel mit reaktiven Epoxygruppen wurde der Fangantikörper VEEWIS1 über die Aminogruppen der Aminosäuren dieses Antikörpers immobilisiert. Für beide Selektionen wurde β -Propionlaktam-inaktivierter Überstand von Verozellen mit $4 \cdot 10^8$ KID₅₀/mL VEEV-TC83 als Antigen verwendet. Es wurden zwei Selektionsrunden mit dem Helferphagen M13K07 generierten Phagen durchgeführt. Zur Präselektion wurden die Phagen auf nicht virusbeladenen Partikeln mit immobilisierten Fangantikörpern und Partikeln mit immobilisierten, wirtszelleigenen Proteinen inkubiert. Exemplarisch zeigt Abb. 3.19 den Ablauf einer Selektion.

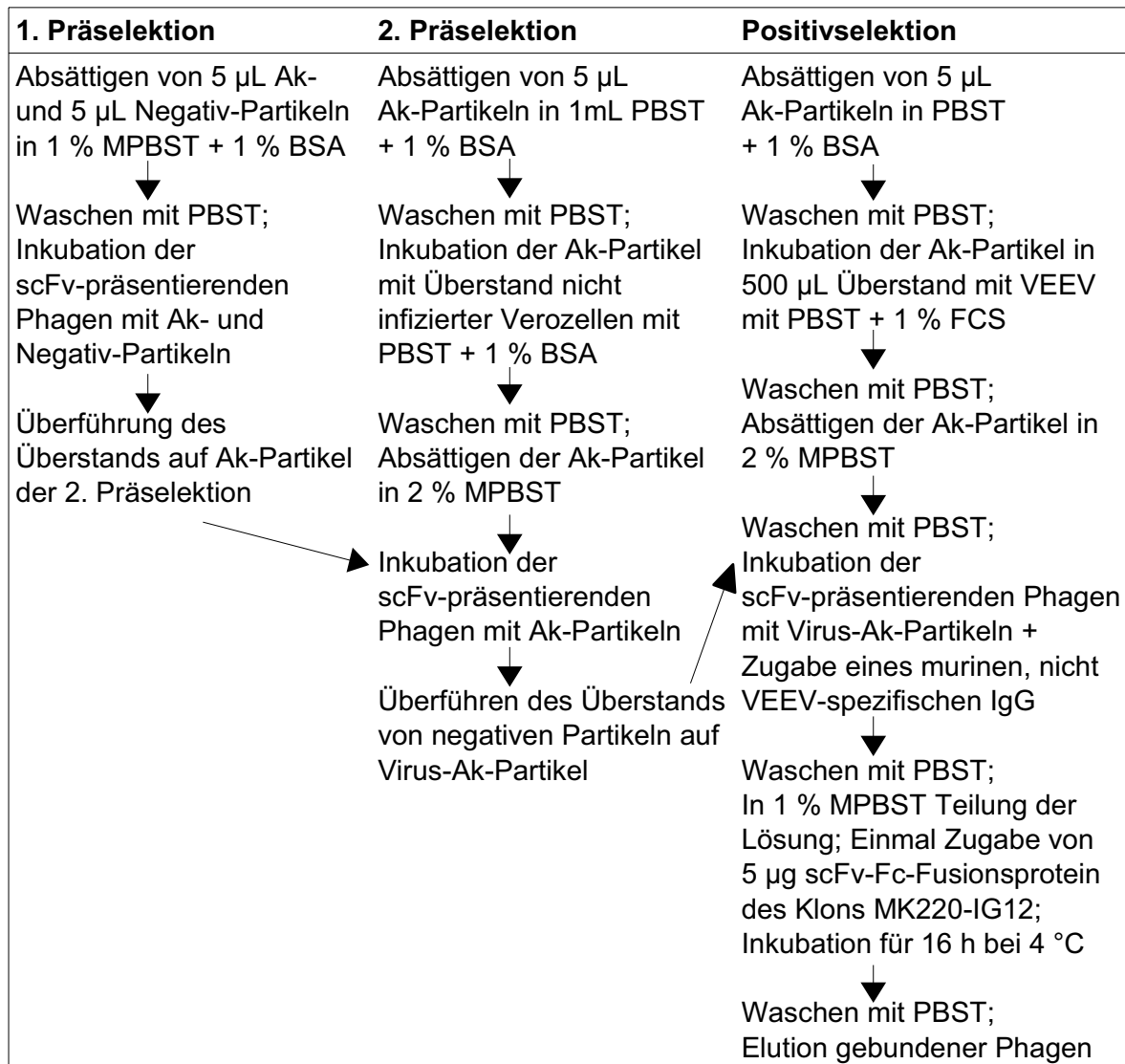


Abb. 3.19: Schematischer Ablauf einer Selektionsrunde für die Affinitätsreifung
Die Abkürzung Ak-Partikel steht für Partikel, auf deren Oberfläche der Fangantikörper VEEWIS1 immobilisiert wurde. Negativ-Partikel bezeichnet Partikel, auf deren Oberfläche wirtszelleigene Proteine immobilisiert wurden.

Bei einer der beiden Selektionen wurde nach der Positivselektion 5 µg des gereinigten humanen scFv-Fc-Fusionsproteins des Klons MK220-IG12 zur Konkurrenz zugegeben. Durch diese Konkurrenz sollten Bindungsstellen auf den Viruspartikeln, die durch die Dissoziation gebundener Phagen zugänglich werden, durch den Überschuss an scFv-Fc-Fusionsproteinen des Originalklons abgesättigt werden. Somit sollte die erneute Bindung von dissoziierten, schwachaffinen Phagen verhindert werden. Die nach einer Selektionsrunde eluierten Phagenmengen waren sowohl mit als auch ohne Konkurrenz des Originalklons sehr gering (Tab. 3.4). Die eluierten Phagenmengen wurden jedoch durch Zugabe des Originalklons verringert, was auf eine erfolgreiche Konkurrenz hindeutet. In der 2. Selektionsrunde zeigte sich ein Anstieg der eluierten Phagenmenge.

Tab. 3.5: Eluierte und eingesetzte scFv-Phagenanzahl

| Selektions- runde | Eingesetzte Phagenanzahl [cfu] | Eluierte Phagenanzahl [cfu] | |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | | Mit Zugabe MK220-IG12 | Ohne Zugabe MK220-IG12 |
| 1 | 10^{11} | 332 | 1200 |
| 2 | 10^9 | 5000 | $4 \cdot 10^4$ |

Zur besseren Beurteilung der Selektion wurde die Spezifität der polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen im Antigen-ELISA getestet. Dabei wurde ein Kontrollphage verwendet, der das Lysozym-spezifische scFv D1.3 (Ward *et al.*, 1989) auf seiner Oberfläche präsentiert. Die Bindung an VRS-konzentrierten Überstand mit und ohne VEEV-TC83 wurde im Vergleich zu der Bindung an den Fangantikörper VEEWIS1 und das Kontrollantigen Lysozym untersucht.

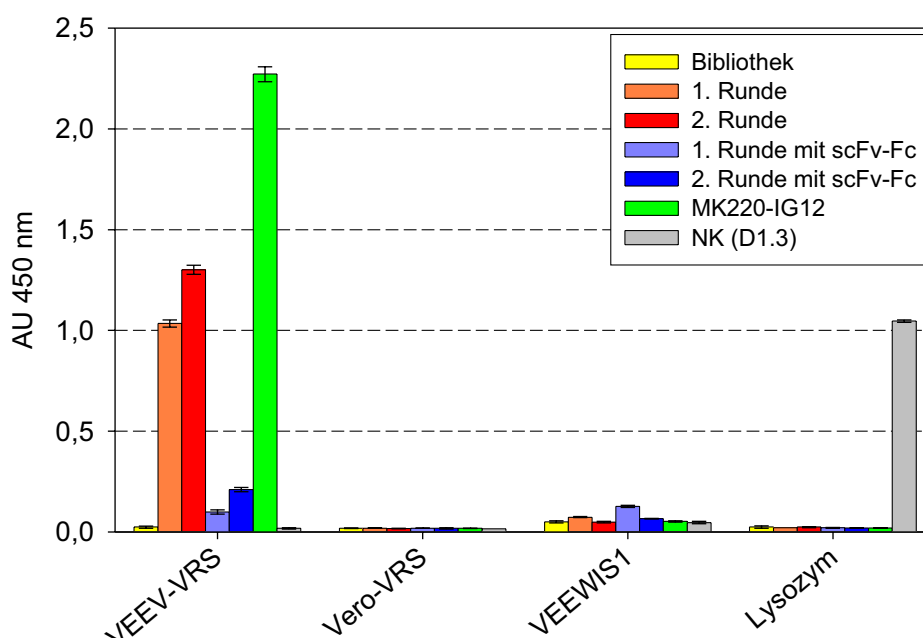


Abb. 3.20: Antigen-ELISA polyklonaler Phagen mit verschiedenen Antigenen

1 µg Lysozym, VEEWIS1, VEEV-TC83-VRS und Vero-VRS wurden adsorptiv immobilisiert. Nach der VEEV-Inaktivierung mit Formalin und des Absättigens mit 2 % MPBST, wurden jeweils 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen pro Kavität inkubiert. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels des Axs Anti-M13-POD (1:5000) und mit TMB. Die Abkürzung scFv-Fc bezeichnet den Einsatz des scFv-Fc-Fusionsproteins des Klons MK220-IG12. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen im ELISA mit Standardabweichung.

Mit beiden Selektionen konnte eine Anreicherung VEEV-spezifischer Phagen erzielt werden (Abb. 3.20). Die Anreicherung war bei der Selektion ohne Konkurrenz des Ursprungsklons (MK220-IG12) effizienter. Während der ersten Selektionsrunde kam es zu einer schwachen Anreicherung von Bindern gegen den Fangantikörper VEEWIS1. Diese Anreicherung wurde in der zweiten Runde durch den Einsatz von weniger Phagen

und somit stringenterer Präselektionen und Konkurrenz minimiert. ScFv-präsentierende Phagen, die VRS-konzentrierten Überstand nicht infizierter Verozellen oder unspezifisch (Lysozymkontrolle) banden, wurden nicht angereichert.

3.4.3 Analyse von Einzelklonen

Um Einzelklone im direkten Vergleich zu dem Originalklon analysieren zu können, wurde das scFv-Gen des Klons MK220-IG12 in den Vektor pHAL14 kloniert. Das scFv-Gen und der Zielvektor pHAL14 wurden mittels der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* geschnitten. Nach der Reinigung, Ligation und Transformation von Bakterien mit diesem Ansatz wurde die Insertion mittels der Oligonukleotide MK-pelB_f und MK-myc_r verifiziert.

Aus den Selektionen wurden 45 Einzelklone der 1. Selektionsrunde und 90 Einzelklone der 2. Selektionsrunde hinsichtlich der Erkennung von VEEV-TC83 untersucht. Diese Einzelklone und der Originalklon wurden kultiviert und die Expression der scFv-Gene mittels IPTG induziert. Nach der Produktion wurden die erhaltenen Überstände mit den löslichen scFv mittels Antigen-ELISA hinsichtlich der Erkennung von VRS-konzentriertem Überstand mit und ohne VEEV-TC83 untersucht (Tab. 3.5).

Tab. 3.6: Anreicherung VEEV-spezifischer scFv aus der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V_H

| Selektion | Mit Zugabe MK220-IG12 | | Ohne Zugabe MK220-IG12 | |
|--|-----------------------|------|------------------------|------|
| Selektionsrunde | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Anzahl untersuchte Klone | 45 | 90 | 45 | 90 |
| Klone mit VEEV-spez. ELISA-Signal von mind. 0,2 AU | 0 | 14 | 12 | 28 |
| Anteil dieser Klone in Prozent | 0 | 15,5 | 26,7 | 31,1 |

Das Ergebnis des Antigen-ELISA der polyklonalen Phagen wurde durch die Analyse der Einzelklone bestätigt. So war die Anreicherung VEEV-spezifischer Klone effizienter ohne Konkurrenz des scFv-Fc-Fusionsproteins des Originalklons. Keiner der untersuchten Klone erkannte VRS-konzentrierten Überstand nicht infizierter Verozellen. Von den löslichen scFv aus der 2. Selektionsrunde, ergaben vier aus der Selektion mit Kompetitor und acht aus der Selektion ohne Kompetitor ein geringfügig höheres Signal als das scFv MK220-IG12. Nach erfolgter Sequenzierung konnten insgesamt neun verschiedene scFv-Klone aus den beiden Selektionen identifiziert werden, die eine verbesserte Erkennung von VEEV im Antigen-ELISA gezeigt hatten. Hiervon wurden drei Klone in

Anwesenheit des Kompetitors (MK287-II) und fünf Klone ohne Kompetitor (MK287-III) selektiert. Der Klon MK287-IIE8 konnte mittels beider Strategien isoliert werden. Die Sequenzierung der scFv-Gene ergab, dass alle scFv wie auch das Fragment MK220-IG12 leichte Ketten der Subfamilie LV3 beinhalteten (Tab. 3.6). Jedoch variierten die Primärsequenzen der isolierten Ketten über die gesamte Länge (Daten nicht gezeigt). Innerhalb des V_H-Gens (HV3, IGHD3-16*01; IGHJ4*02) wurde keine Abweichung zu der Sequenz des Ursprungsklons gefunden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.7: Keimbahnlinien der V_L der isolierten scFv

| Klon | VL | |
|------------|------------|----------|
| | LV | LJ |
| MK220-IG12 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK287-IIG8 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*02 |
| MK287-IIE8 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK287-IIF8 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*01 |
| MK287-IIG7 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*01 |

| Klon | VL | |
|--------------|------------|----------|
| | LV | LJ |
| MK287-IIIF3 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK287-IIIH8 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK287-IIIG10 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK287-IIIF10 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*01 |
| MK287-IIIA8 | IGLV3-1*01 | IGLJ3*01 |

Für eine Einordnung der Klone hinsichtlich ihrer Affinität wurde mit diesen Klonen der Antigen-ELISA mit verschiedenen Verdünnungen ihrer scFv wiederholt, nachdem mittels Western Blot die Konzentrationen der Antikörperfragmente in den Überständen bestimmt worden waren (Abb. 3.21)

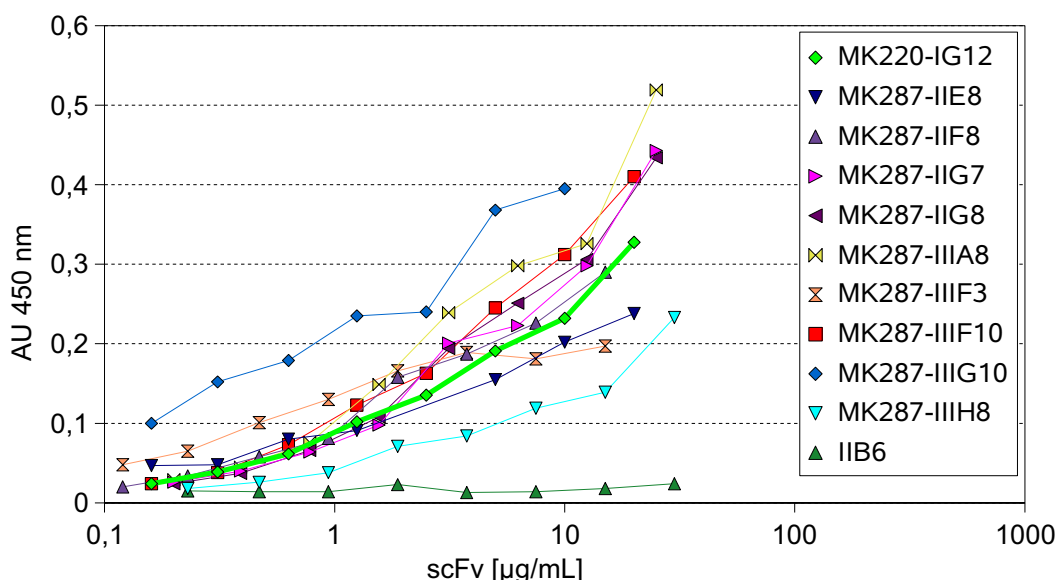


Abb. 3.21: Antigen-ELISA mit scFv in Abhängigkeit von der Konzentration

1 µg VEEV-TC83-VRS wurde adsorptiv immobilisiert. Es folgte die VEEV-Inaktivierung mit Formalin. Die aus dem Überstand gebundenen scFv wurden über den fusionierten c-myc-Tag mittels des Ak 9E10 (1:10) nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mittels des Ak Anti-Maus-Fc-POD (1:10000) mit dem Substrat TMB. Die Werte der Klons MK220-IG12 sind zum besseren Vergleich hervorgehoben.

Obwohl die verwendeten Konzentrationen der scFv nicht ausgereicht haben, um eine Antigensättigung zu erreichen, scheinen einige der erzeugten Antikörperfragmente verbesserte Eigenschaften zum Nachweis von VEEV aufzuweisen. Der Klon MK287-IIIIG10 führt bei gleicher Konzentration zu höchsten Signalintensitäten aller verwendeten scFv. Hierfür kann sowohl eine Affinitätsverbesserung als auch die Erkennung eines anderen Epitops die Ursache sein.

3.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des WIS-Antikörpers 8/6

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D VEEV-spezifischer Antikörper wurde eine Methode mit kompletten VEEV-Partikeln mittels der Oberflächenplasmonresonanz etabliert. Da es sich bei dem Analyten, dem WIS-Antikörper 8/6, um ein bivalentes Molekül handelt, kann eine K_D nur im Gleichgewicht bestimmt werden. Der Fangantikörper VEEWIS1 wurde über eine Aminkopplung bis zur Sättigungsgrenze an die Dextranmatrix eines CM3-Chips gekoppelt (ca. 10000-12000 RU). Nach Immobilisierung von VEEV-TC83 aus 75 μ L Überstand infizierter Verozellen wurde der Bindungsverlauf des WIS Antikörpers 8/6 bei verschiedenen Molaritäten aufgenommen (Abb.3.22).

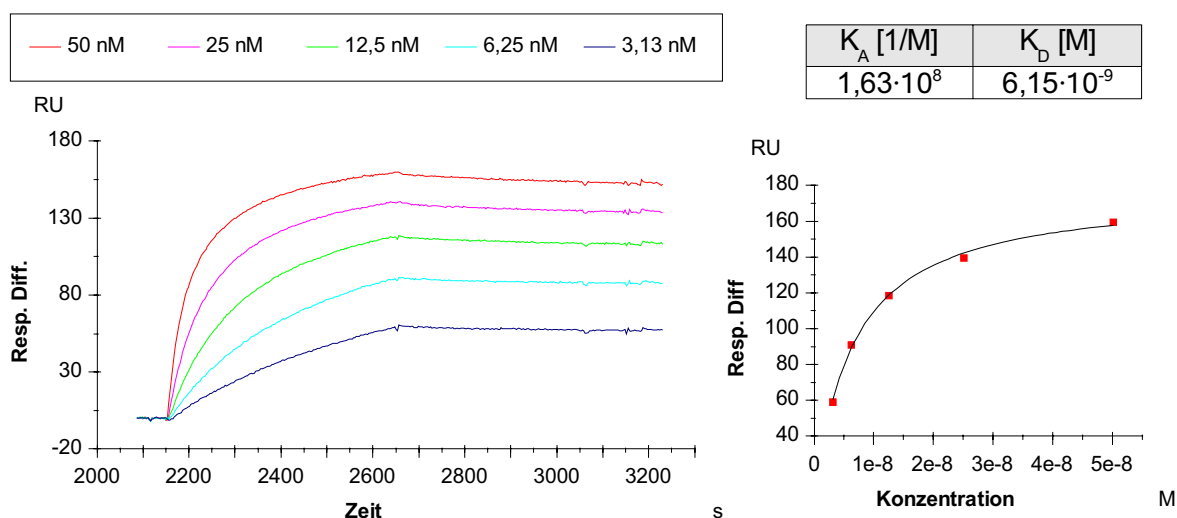


Abb. 3.22: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des WIS-Antikörpers mAk 8/6
Nach Kopplung des WIS-mAk VEEWIS1 an einen CM3-Chip erfolgte die Immobilisierung von VEEV aus 75 μ L Zellkulturüberstand. Anschließend wurden 5 Konzentrationen (3,13 bis 50 nM) des WIS-mAk 8/6 über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Kurven wurden mit der Software Biaevaluation ausgewertet. Dabei wurde die Affinität im Gleichgewicht bestimmt.

Die ermittelte Dissoziationskonstante K_D des WIS-Antikörpers 8/6 beträgt $6,15 \cdot 10^{-9}$ M (Abb. 3.22). Zwar wurde das Gleichgewicht bei den niedrigeren Konzentrationen nicht erreicht, trotzdem wurden diese Werte als Näherung bei der Berechnung berücksichtigt.

4 Diskussion

4.1 VEEV-spezifische Antikörperfragmente aus universellen Antikörpergenbibliotheken

4.1.1 Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente aus universellen Antikörpergenbibliotheken

In dieser Arbeit wurden erstmals humane, VEEV-spezifische Antikörperfragmente aus universellen, naiven Antikörpergenbibliotheken isoliert. Eine erfolgreiche Selektion VEEV-spezifischer scFv gelang dabei aus den naiven Bibliotheken Heidelberg und HAL4/7. Die zu Beginn durchgeführten Isolierungen aus den Antikörpergenbibliotheken Tomlinson (I+J) und Heidelberg zeigten, welche Probleme bei einer Selektion mit Viruspartikeln auftreten können. Nur das isolierte Antikörperfragment MK220-IG12 aus der Bibliothek Heidelberg erkannte spezifisch VEEV. Die restlichen selektierten Klone der Antikörpergenbibliothek Heidelberg und alle isolierten Klone der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J) erkannten VRS-konzentriertes Zellmaterial, sowohl mit als auch ohne Viren. Trotzdem wurden diese Klone nach der Analyse im monoklonalen Antigen-ELISA, mit Überstand nicht infizierter Verozellen als Negativkontrolle, als VEEV-spezifisch eingeordnet. Die Beurteilung der Spezifität dieser isolierten Antikörperfragmente war jedoch erst nach Aufkonzentrierung des Zellkulturüberstandes nicht infizierter Verozellen mit dem *Virus Recovery System* (VRS) möglich. Durch diese VRS-Konzentrierung wurde die Zusammensetzung des Zellkulturüberstandes verändert. Alle aus diesen Antikörpergenbibliotheken isolierten Antikörperfragmente, außer dem Fragment MK220-IG12, erkannten Antigene, die erst nach dieser Konzentrierung nachweisbar waren. Das bedeutet, dass diese Antigene durch das zur Virusreinigung eingesetzte System angereichert wurden. Diese Problematik bei der Isolierung spezifischer Antikörper gegen Viren wurde bisher in keiner Publikation behandelt. Die bisher beschriebenen Selektionen virusspezifischer Antikörperfragmente mit kompletten Viruspartikeln wurden mit Viruspräparationen durchgeführt, die durch Zentrifugation in einem Zucker- oder Glyceringradienten gereinigt waren (Griep *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2003; Van den Brink *et al.*, 2005). Nur

Duggan *et al.* (2001) führten die Selektion gegen VEEV mit PEG-präzipitierten Viruspartikeln durch.

Aufgrund der Anreicherung zahlreicher Antikörperfragmente aus den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson (I+J), die spezifisch Zellkulturmaterial nicht infizierter Zellen erkannten, wurden optimierte Strategien zur erfolgreichen Isolierung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente entwickelt. Diese Strategien ermöglichten eine Selektion virusspezifischer Antikörperfragmente, obwohl das Antigen in Form der Viruspartikel verunreinigt und schwach konzentriert vorlag. Sie beinhalteten die direkte bzw. indirekte Antigenimmobilisierung in Mikrotiterplatten und den Einsatz von unterschiedlich aufgereinigten Viruspartikeln. Zudem wurde die scFv-Genbibliothek HAL4/7 mit einer im Vergleich zu den anderen Antikörpergenbibliotheken erhöhten Diversität verwendet (Hust *et al.*, 2007b). Von den fünf verfolgten Strategien erwies sich *Ak-VRS* als beste Strategie, um VEEV-spezifische Antikörperfragmente zu isolieren. Dabei wurde VRS-konzentriertes Virusmaterial mittels Fangantikörper in Mikrotiterplatten immobilisiert. Obwohl bei dieser Selektion spezifische Phagen gegen die Fangantikörper stark angereichert wurden, konnten mit dieser Strategie zehn der elf VEEV-spezifischen Antikörper isoliert werden. Die hier aufgezeigten Vorteile der Antikörper-basierten Immobilisierung könnten in einer weiteren Anreicherung der Viruspartikel, sowie einer verbesserten Antigenpräsentation begründet sein. Zwei weitere der fünf Selektionsstrategien, *Saccharose* und *1/5-VRS*, führten ebenfalls zum Erfolg. Dabei wurden aus der Selektion *Saccharose* dieselben zwei Antikörperfragmente wie aus der Selektion *1/5-VRS* isoliert. Eines dieser beiden scFv war CHN24-2C2, welches bereits bei der erfolgreichsten Selektion *Ak-VRS* am stärksten angereichert worden war. Das andere scFv MK271-G2 konnte nur auf Basis der Selektionen *Saccharose* und *1/5-VRS* isoliert werden. Die zwei weiteren durchgeführten Selektionen *VRS* und *Ak-SN* führten nicht zum gewünschten Erfolg. Bei der Strategie *Ak-SN* zeigte schon der polyklonale Phagen-ELISA, dass nur eine Anreicherung spezifischer Phagen gegen die Fangantikörper stattgefunden hatte. Diese nicht erfolgreiche Selektion verdeutlicht, dass die Anreicherung von Viruspartikeln mittels immobilisierter Antikörper ohne vorherige Konzentrierung der Viren für eine erfolgreiche Selektion nicht ausreicht. Somit zeigt der Erfolg der Strategie *Ak-VRS*, dass eine erhöhte Menge an eingesetztem Virus für eine Isolierung von Bindern aus naiven Antikörpergenbibliotheken essentiell ist. Bei einem Einsatz einer Immunbibliothek kann vielleicht die geringere Virusmenge ohne vorherige Konzentrierung ausreichen, da bei Vorhandensein hochaffiner Antikörperfragmente durchaus eine Selektion mit sehr wenig Antigen zum Erfolg führen kann (Schier *et al.*, 1996).

Bei Vergleich der entwickelten Selektionsstrategien, mit den in der Literatur beschriebenen Selektionen gegen komplette Viruspartikel, erscheinen die in dieser Arbeit konzipierten Selektionsstrategien kompliziert. Bisher wurden kaum Präselektionen beschrieben. Van den Brink *et al.* (2005) führten eine Adsorption von scFv-präsentierenden Phagen an fötalem Kälberserum durch, bevor diese anschließend zur spezifischen Bindung auf die Viruspartikel überführt wurden. Nur für Selektionen von Antikörpern gegen Zelloberflächenproteine sind mehrfache Präselektionsverfahren beschrieben (Huie *et al.*, 2001). Die Verwendung von Fangantikörpern in der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, dass trotz Präselektion und Kompetition mit diesen Molekülen die Anreicherung IgG-spezifischer Phagen kaum verhindert werden kann. Antikörper scheinen starke immunogene Bereiche aufzuweisen, die beim Einsatz einer universellen Antikörpergenbibliothek zur Anreicherung vieler IgG-spezifischer Phagen führen. Da bei den bisher beschriebenen Selektionen virusspezifischer Binder ausschließlich adsorptiv immobilisierte Viruspartikel verwendet wurden (Duggan *et al.*, 2001; Van den Brink *et al.*, 2005), sind diese Probleme nicht aufgetreten.

4.1.2 Sequenzvergleich der isolierten Antikörperfragmente

Insgesamt wurden zwölf VEEV-spezifische Antikörperfragmente in dieser Arbeit aus den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg- und HAL4/7 isoliert. Auffällig hierbei ist, dass alle isolierten scFv leichte Ketten des Typs Lambda beinhalten, obwohl die beiden naiven Antikörpergenbibliotheken, aus denen diese Klone isoliert wurden, Gene für die variablen Bereiche von Lambda- und Kappa-Ketten beinhalten. Diese offensichtlich bevorzugte Beteiligung von Lambda-Ketten bei VEEV-spezifischen Bindern kann den bisherigen Publikationen nicht entnommen werden, da hier der Typ der leichten Kette meist nicht benannt wurde. Zwei von Duggan *et al.* (2001) und Hunt *et al.* (2006) beschriebene murine Antikörper gegen VEEV beinhalten jedoch leichte Ketten des Typs Kappa. Hierbei ist die unterschiedliche Verteilung der Familien leichter Ketten zwischen humanen und murinen Organismen zu berücksichtigen. Während bei Mäusen der Typ Kappa 20-mal häufiger vorkommt, so kommt er im Menschen nur doppelt so oft wie der Typ Lambda vor (Janeway *et al.*, 2002). Weitere Unterschiede sind die Herstellung und die verschiedenen Molekülformate der generierten VEEV-spezifischen Binder. Im Gegensatz zu der hier verwendeten Phagen-Display-Technologie wurden alle murinen Antikörper mittels Hybridomatechnologie generiert. Eine weitere Erklärung für das alleinige Auftreten von Lambda-Antikörperfragmenten kann eine bessere Bindung von scFv mit den im

Durchschnitt mehr Aminosäuren umfassenden Lambda-Ketten sein. Eventuell besitzen Antikörperfragmente mit leichter Kette dieses Typs Vorteile bei der Erkennung komplexer Strukturen auf der Virusoberfläche. Zudem wurde die Teilbibliothek HAL4, die nur Gene von scFv mit Kappa-Ketten beinhaltet, im Vergleich zu der entsprechenden Lambda-Teilbibliothek HAL7 nicht so umfassend generiert. Die Bibliothek HAL4 enthält nur Gene der Kappa-Subfamilien KV1, KV3 und KV4. Des Weiteren konnten aus der Antikörpergenbibliothek Tomlinson (I+J), die nur Antikörperfragmente mit Kappa-Ketten beinhaltet, keine VEEV-spezifischen Antikörperfragmente isoliert werden.

Vergleicht man die ursprünglichen Keimbahnlinien, von denen die generierten Antikörperfragmente der Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und HAL4/7 abstammen, so gibt es bei beiden variablen Bereichen bevorzugte Subfamilien. Sieben der zwölf Antikörperfragmente beinhalten variable Bereiche der Subfamilie LV3, von welchen wiederum vier von der Keimbahnlinie IGLV3-1 und drei von der Keimbahnlinie IGLV3-21 abstammen. Weitere drei Antikörperfragmente beinhalten eine V_L der Subfamilie LV2 und jeweils ein scFv enthält eine Domäne der Subfamilien LV1 oder LV6. Im humanen Serum sind leichte Ketten der Subfamilie LV3 nach der Subfamilie LV1 die zweithäufigsten mit 40 % aller Lambda-Ketten (Abe *et al.*, 1994).

Sechs der zwölf isolierten Antikörperfragmente beinhalten eine V_H der Subfamilie HV1, vier der Subfamilie HV3 und zwei der Subfamilie HV4. Für die Lambda-Teilbibliothek HAL7 ist die prozentuale Verteilung der Subfamilien der beiden variablen Domänen, V_H und V_L , nicht bekannt.

4.1.3 Charakterisierung der isolierten Antikörperfragmente

Die weitergehende Charakterisierung der generierten Antikörperfragmente erfolgte durch den Einsatz monoklonaler scFv-präsentierender Phagen. Zuvor war die Bindung der Antikörperfragmente ohne Fusion an Phagenpartikel im Antigen-ELISA in den Formaten scFv oder scFv-Fc-Fusionsprotein nachgewiesen worden. Um die erhaltenen Klone hinsichtlich ihrer monovalenten Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurden die scFv-präsentierenden Phagen mit dem Helferphagen M13K07 (Vieira und Messing, 1987) generiert. Der Einsatz von Phagen hat viele Vorteile, da die Produktion, Reinigung sowie die quantitative und qualitative Beurteilung der Phagenpartikel schnell und einfach durchführbar sind (Hust *et al.*, 2007c). Gebundene Phagen können durch Detektion des Phagenhüllprotein pVIII mittels eines direkt konjugierten Antikörpers nachgewiesen werden. Dieser Nachweis bringt eine starke Signalverstärkung mit sich, da

bis zu 2700 Kopien des Hüllproteins pro Phagenpartikel enthalten sind. Zudem interferiert dieses Nachweissystem nicht mit den murinen Fangantikörpern, die zur Bestimmung der Kreuzreaktivität benötigt wurden. Die Ausbeuten der einzelnen Phagenproduktionen waren untereinander vergleichbar und für den Einsatz in der weitergehende Analyse ausreichend (Daten siehe Anhang). Zusätzlich wurde bei der Kontrolle aller Phagenpräparationen scFv-pIII-Fusionsprotein in ähnlichen Mengen auf der Oberfläche der Phagen mittels Immunfärbung nachgewiesen. Somit konnten alle Präparationen in den weiteren Untersuchungen eingesetzt und verglichen werden.

Mit allen VEEV-spezifischen Phagen konnte VRS-konzentriertes VEEV-TC83, adsorptiv immobilisiert, im Antigen-ELISA nachgewiesen werden. Hierbei erkannten die isolierten Antikörperfragmente sowohl Formalin-inaktiviertes als auch aktives VEEV-TC83.

Anschließend wurde die Erkennung von VEEV-Proteinen im Zelllysate infizierter Verozellen durch die generierten scFv-präsentierenden Phagen untersucht. Im Zelllysate Alphavirus-infizierter Zellen liegen vermehrt einzelne, noch nicht zu vollständigen Viruspartikeln assemblierte virale Proteine vor (Strauss und Strauss, 1994). Die Erkennung dieser Proteine wird dabei durch den Hintergrund der wirtszelleigenen Proteine der Verozellen erschwert. Alle Antikörperfragmente mit Ausnahme der scFv CHN24-2A1 und MK269-E11 erkannten VEEV-Proteine im Zelllysate infizierter Verozellen. Der fehlende Nachweis der VEEV-Proteine mittels dieser Antikörperfragmente kann in der Präparationsart des verwendeten Antigens oder in einer geringeren Antigenmenge in den Verozellen, die hierbei nicht spezifisch bestimmt werden konnte, begründet sein.

Zusätzlich wurde mit den isolierten Antikörperfragmenten eine immunhistochemische Färbung infizierter Verozellen durchgeführt. VEEV-infizierte Verozellen konnten nach Formalinfixierung mit allen Phagenpräparationen, außer der des Klon CHN24-2A1, erfolgreich angefärbt werden. Bei dieser Methode werden besonders die schon in der Zellmembran integrierten VEEV-Glykoproteine nachgewiesen. Eine intrazelluläre Färbung der Proteine erfolgt bei dieser milden Behandlung der Zellen kaum. Nach einer VEEV-Infektion kommt es bei den infizierten Zellen zu Ausstülpungen der Zelloberfläche, worin virale Proteine stark angereichert sind. Hier beginnt das Austreten von Viruspartikeln aus der Zelle (Rosen *et al.*, 1995). Möglicherweise führt diese lokale Konzentrierung der viralen Strukturproteine zu der aufgetretenen körnigen Färbung der Zelloberfläche VEEV-infizierter Zellen.

In Bezug auf die Erkennung von weiteren Arten der Gattung Alphavirus und verschiedenen VEEV-Stämmen wurde die Kreuzreaktivität der selektierten Antikörperfragmente bestimmt. Die Kreuzreaktionen der vier Klone CHN24-2A1, CHN24-2B7, MK269-E11 und CHN24-2C3 war im Sandwich-ELISA nicht eindeutig

nachweisbar. Die zur Bestimmung der Kreuzreaktivität eingesetzten Viren konnten durch das Antikörperfragment CHN24-2A1 nicht und durch die scFv CHN24-2B7 und MK269-E11 nur in geringem Umfang nachgewiesen werden. Das Antikörperfragment MK269-E11 erkannte nur den VEEV-Stamm 230. Eine geringe Affinität der scFv CHN24-2A1, CHN24-2B7 und MK269-E11 und eine geringere Virusmenge könnten diese Ergebnisse erklären, da durch den Antigen-ELISA mit adsorptiv immobilisiertem und VRS-konzentriertem VEEV-TC83 eine Erkennung dieses Stammes bereits gezeigt wurde. Das Antikörperfragment CHN24-2C3 scheint den murinen Fangantikörper VEEWIS1 mit einer geringen Affinität zu erkennen, da dieser Klon ein Signal auf Zellkulturüberstand nicht infizierter Zellen in den Kavitäten mit diesem immobilisiertem Antikörper zeigt. In den Kavitäten mit immobilisierten Antikörper-Mix, scheint der Fangantikörper VEEWIS1 so verdünnt vorzuliegen, dass die Erkennung dieses Antikörpers dort kein messbares Signal liefert. Mit den weiteren acht Antikörperfragmenten, als Detektionsantikörper eingesetzt, konnten im Sandwich-ELISA alle in der Arbeit verwendeten VEEV-Stämme nachgewiesen werden. Das Signalverhältnis zwischen den verschiedenen VEEV-Stämmen war für die untersuchten Antikörperfragmente und den WIS-Antikörper 8/6 sehr ähnlich. Es entspricht den eingesetzten Virusmengungsverhältnissen der verschiedenen VEEV-Stämme. Keines der selektierten Antikörperfragmente, eingesetzt als Detektionsantikörper, zeigte eine spezifische Kreuzreaktion mit anderen Arten der Alphaviren. Diese fehlende Kreuzreaktivität könnte eine spezifische Detektion von VEEV mit den generierten Antikörperfragmenten ermöglichen. Aufgrund der nicht nachweisbaren Kreuzreaktivität mit anderen Alphaviren ist die Erkennung des Virusoberflächenprotein E2 zu vermuten, weil dieses Glykoprotein bei den verschiedenen Vertretern der Alphaviren stärker variiert (Griffin *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden spezifische Immunfärbungen elektrophoretisch getrennter VEEV-Proteine mit den isolierten Antikörperfragmenten durchgeführt. Die Bindung der generierten Antikörperfragmente an unvollständig denaturierte (56 °C, 20 Minuten, nicht-reduzierender Laemmli-Puffer) und vollständig denaturierte (95 °C, 5 Minuten, reduzierender Laemmli-Puffer) VEEV-Proteine wurde in zwei Antikörperformaten analysiert. Zum einen wurden scFv-präsentierende Phagen und zum anderen scFv-Fc-Fusionsproteine für diesen Nachweis virusspezifischer Proteine verwendet. Interessanterweise erkannten alle isolierten Antikörperfragmente strukturelle Epitope. Die Strukturen dieser Epitope waren nur nach der Inkubation für 20 Minuten bei 56 °C unter nicht-reduzierenden Bedingungen noch soweit erhalten, dass sie von den Antikörperfragmenten erkannt werden konnten. Dies konnte sowohl für die

scFv-präsentierenden Phagen als auch für die scFv-Fc-Fusionsproteine eindeutig gezeigt werden. Die selektierten Antikörperfragmente erkannten hauptsächlich zwei Proteinstrukturen, die ebenfalls mit dem E2-spezifischen WIS-Antikörper 8747 nachgewiesen wurden. Diese Proteine wurden bei apparenten Molekularmassen von ca. 50 kD und 100 kD durch die VEEV-spezifischen Antikörper(-fragmente) detektiert. Das bei 50 kD nachgewiesene Protein wird den Oberflächenproteinen E1 und E2 zugeordnet, die ohne Berücksichtigung ihrer Glykosylierungen theoretische molekulare Massen von 47,9 kD (E1, NP741967) und 46,9 kD (E2, NP741966) aufweisen. Nach erfolgter elektrophoretischer Bestimmung gaben Roehrig und Mathews (1985) die molekularen Massen der Glykoproteine E1 mit 50 kD und E2 mit 56 kD an. Das während der Elektrophorese langsamer laufende Protein mit einer apparenten Molekülmasse von 100 kD, wurde von Roehrig und Mathews einem unbekannten Protein zugeordnet. Aufgrund der Dimerbildung der beiden Oberflächenproteine E1 und E2 könnte es sich hier um nicht dissoziierte Heterodimere handeln, zumal die apparente Molekülmasse der theoretischen molekularen Masse sehr nahe kommt. Jedoch bleibt die elektrophoretische Bestimmung der Molekularmassen aufgrund der vorhandenen Zuckerstrukturen sowie der unvollständigen Denaturierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen ungenau. Diese Ungenauigkeit verdeutlicht die Silberfärbung der getrennten Virusproben, welche das unterschiedliche Laufverhalten von vollständig und nur unvollständig denaturiertem Virusmaterial zeigte. Die Anfärbung von VEEV-Proteinen mittels scFv-präsentierender Phagen führte z. B. bei den Fragmenten CHN24-2C2 und MK220-IG12 zur Detektion von Proteinen in einem großen kD-Bereich. Im Gegensatz dazu führte die Färbung mit den scFv-Fc-Fusionsproteinen dieser Fragmente zum Nachweis zweier definierter Proteinbanden. Somit scheint bei dem sehr sensitiven Nachweis gebundener Phagen eine Überfärbung der VEEV-Proteine aufzutreten. Trotz der Überfärbung ist der Nachweis, wegen der nicht angefärbten Proteine von VRS-konzentriertem Zellkulturüberstand nicht infizierter Zellen durch diese Phagen sowie die Negativkontrolle mit den Phagen IIB6, als spezifisch einzuordnen. Einige von Roehrig und Mathews (1985) untersuchten Antikörper erkannten gegenüber SDS und β -Mercaptoethanol stabile Epitope. Laut Roehrig und Mathews erkannte die Mehrheit der Oberflächenprotein E2-spezifischen Antikörper strukturunabhängige Epitope, während E1-spezifische Antikörper fast ausschließlich an strukturelle Bereiche banden. Diese Beobachtung wurde durch die Ergebnisse von Razumov *et al.* (1991) mit monoklonalen, VEEV-spezifischen Rattenantikörpern bestätigt. Da mit den in der vorliegenden Arbeit isolierten Antikörperfragmente Proteinbanden detektiert werden konnten, die ebenfalls von dem E2-spezifischen WIS-Antikörper erkannt wurden, lässt dies auf die Erkennung

des Oberflächenprotein E2 durch die generierten Binder schließen.

Zusammengefasst ergab die Charakterisierung der zwölf VEEV-spezifischen Antikörperfragmente die in der Tab. 4.1 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 4.1: Zusammenfassende Darstellung der immunologischen Daten, erhalten mit den verschiedenen Antikörperfragmenten

Das Zeichen „+“ kennzeichnet eine erfolgreiche Detektion im jeweiligen Versuch

Das Zeichen „—“ kennzeichnet eine nicht erfolgreiche Detektion im jeweiligen Versuch

| Klon/ Antikörperfragment | Antigen- ELISA VEEV-VRS | Antigen- ELISA Zellysat | Zell- färbung | Bestimmung der Kreuzreaktionen | Immun- färbung |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| CHN24-2A1 | + | — | — | — | + |
| CHN24-2A2 | + | + | + | + | + |
| CHN24-2B7 | + | + | + | — | + |
| CHN24-2C2 | + | + | + | + | + |
| CHN24-2C3 | + | + | + | — | + |
| CHN24-2D5 | + | + | + | + | + |
| CHN24-2F11 | + | + | + | + | + |
| MK269-E10 | + | + | + | + | + |
| MK269-E11 | + | — | + | — | + |
| MK269-E12 | + | + | + | + | + |
| MK271-G2 | + | + | + | + | + |
| MK220-IG12 | + | + | + | + | + |

Die in dieser Arbeit generierten scFv-Fc-Fusionsproteine ermöglichen die Verwendung der VEEV-spezifischen Antikörperfragmente als Fang- und als Detektionsantikörper. Für den Nachweis von Pathogenen sind Antikörperformate mit Fc-Region, wie IgG oder scFv-Fc-Fusionsproteine, nicht erforderlich. Im Bereich der Detektion von Pathogenen weisen diese nur als Fangantikörper Vorteile gegenüber scFv-präsentierenden Phagen auf, da wesentlich mehr antigenbindende Moleküle auf einer kleinen Fläche immobilisiert werden können. Durch die Fusion mit der Fc-Region eines humanen IgG1 erhält man zudem die Option, die in dieser Arbeit generierten humanen Antikörperfragmente in der Therapie einzusetzen. Für therapeutische Zwecke ist eine in dem Molekül enthaltene Fc-Region notwendig, da diese Effektorfunktionen auslöst. Antikörper humanen Ursprungs zeigen häufig eine bessere Verträglichkeit, sowie eine länger anhaltende Wirkung im menschlichen Organismus als Antikörper anderen Ursprungs. Dieser Sachverhalt beruht vor allem auf der Bildung von körpereigenen Antikörpern gegen injizierte Fremdanikörper (Klee, 2000). Der mögliche Einsatz für die Therapie humaner VEEV-Infektionen ist bisher nur für einen einzigen humanisierten VEEV-spezifischen Antikörper gegeben (Hunt *et al.*, 2006).

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die den vielseitigen Einsatz scFv-präsentierender

Phagen für ein breites Spektrum der Detektion von Alphaviren darstellt. So konnten mit diesen Molekülen neben Antigen-ELISA mit verschiedenen adsorptiv immobilisierten Viruspräparationen auch Kreuzreaktionen und Immunfärbungen erfolgreich durchgeführt werden. Zudem wurde hier erstmals die Verwendung von scFv-präsentierenden Phagen zum Nachweis von VEEV-Proteinen auf Zellen verwendet. Durch dieses breite Anwendungsspektrum sowie der weiteren Vorteile der kostengünstigen und einfachen Produktion könnten Phagen in Zukunft häufiger für den Nachweis von Viren verwendet werden. Eine schon beschriebene Methode des Einsatzes von scFv-präsentierenden Phagen für die Detektion von Antigenen ist eine Immuno-PCR mit Phagenpartikeln (Guo *et al.*, 2006). Hierbei werden nach erfolgter Bindung der Phagenpartikel an das jeweilige Antigen die enthaltenen DNA-Moleküle mittels PCR nachgewiesen, was zu einer verbesserten Nachweisgrenze führt. Die für Phagen beschriebene Problematik eines erhöhten unspezifischen Hintergrunds in Bindungsversuchen (Park *et al.*, 2000) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

4.2 V_L-Kettenaustausch des Antikörperfragments MK220-IG12

4.2.1 Die Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V_H

Auf Basis des VEEV-spezifischen Klons MK220-IG12 wurde eine neue Antikörpergenbibliothek mit einem Genrepertoire für verschiedene V_L erstellt. Aufgrund der Diversität der V_L-Gene, sollte es möglich sein, Abkömmlinge des Originalklons zu selektieren, die verbesserte Bindungseigenschaften an VEEV zeigen. Zum Aufbau der Antikörpergenbibliothek, MK273-220-IG12-V_H, konnte auf das komplette Lambda-Repertoire der naiven Antikörpergenbibliothek HAL7 zurückgegriffen werden. Die vorhandene Mischung von Plasmiden HAL14-VL enthielt theoretisch $2,3 \cdot 10^8$ V_L-Gene der Subfamilien LV1 bis LV10 in dem Phagen-Display-Vektor pHAL14 (Hust, persönliche Mitteilung, TU Braunschweig). Nach der Insertion des V_H-Gens des Klons MK220-IG12 in die Plasmide pHAL14-VL wurden vier Teilbibliotheken mit einer Diversität von zusammengefasst $1,5 \cdot 10^8$ unabhängigen Klonen generiert. Aufgrund der 30 Lambda- und der vier J-Gensegmente können durch Kombination 120 verschiedene funktionelle Ketten des Typs Lambda im Menschen entstehen (Janeway *et al.*, 2002). Auch unter Berücksichtigung der im menschlichen Organismus anschließenden Diversitätserhöhung der Lambda-Ketten durch Integration von P- und N-Nukleotiden und

somatischer Mutation erscheint die Größe der Bibliothek ausreichend.

Die erstellte Antikörpergenbibliothek wurde molekularbiologisch analysiert. Dazu wurden 47 Klone mittels PCR auf die Insertion der cDNA eines kompletten scFv untersucht. Von den analysierten Klonen enthielten 96 Prozent ein vollständiges scFv-Gen. Im Vergleich zu anderen Antikörpergenbibliotheken, die für einen Kettenaustausch generiert wurden, ist dies ein hoher Prozentsatz von Klonen mit vollständiger Insertion des scFv-Gens (Schier *et al.*, 1996). Fünf der PCR-Produkte wurden sequenziert. Es wurden Ketten der Subfamilien LV1, LV2 und LV6 identifiziert. Bei dieser geringen Stichprobe lässt sich über die Verteilung der einzelnen Teilfamilien in der erstellten Antikörpergenbibliothek keine statistisch gesicherte Aussage treffen. Zudem wurde die Präsentation der polyklonalen scFv auf den mit den Helferphagen M13K07 und Hyperphage verpackten Phagen der Antikörpergenbibliothek MK273-220-IG12-V_H untersucht. Diese war stärker ausgeprägt als die von Rondot *et al.* (2001) dargestellte Präsentation eines phOx-spezifischen Antikörperfragments nach Verpackung mit den beiden Helferphagen.

4.2.2 Selektion VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit V_L-Austausch

Für die Isolierung neuer Antikörperfragmente mit ausgetauschter V_L zum verbesserten Virusnachweis, wurde VEEV über den Fangantikörper VEEWIS1 kovalent an magnetische Partikel gekoppelt. Für zwei Selektionsrunden dienten β -Propionlaktin-inaktivierte Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand VEEV-infizierter Verozellen als Antigen. Für diese Isolierung wurden mithilfe des Helferphagen M13K07 generierte scFv-präsentierende Phagen eingesetzt, die eine monovalente Präsentation der Antikörperfragmente auf ihrer Oberfläche zeigen. Mögliche Aviditätseffekte wurden somit während der Selektion verhindert. Für eine erfolgreiche Isolierung VEEV-spezifischer scFv wurden Präselektionen auf Partikeln mit dem gekoppelten Fangantikörper VEEWIS1 und eine Konkurrenz mit einem nicht VEEV-spezifischen, murinen Antikörper während der eigentlichen Selektion durchgeführt. Dies war notwendig, da bei früheren Selektionsversuchen aus dieser Antikörpergenbibliothek scFv-präsentierende Phagen gegen den Fangantikörper VEEWIS1 angereichert wurden (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von Fangantikörpern in einem Selektionsprozess erscheint somit auch bei Verwendung einer nicht universellen Antikörpergenbibliothek problematisch. Eine *in-vitro*-Affinitätsreifung virusspezifischer Antikörperfragmente unter Verwendung kompletter Viruspartikel ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Die

Affinitätssteigerung eines Zelloberflächenprotein-spezifischen scFv konnte durch Selektion mit der Phagen-Display-Technologie auf Zellen ohne komplizierte Präselektion erfolgreich durchgeführt werden (Huls *et al.*, 2001). Dabei entfiel die Immobilisierung mittels Fangantikörper.

Die Isolierung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente mit ausgetauschter V_L wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt. Bei einem Ansatz wurde nach der Positivselektion das scFv-Fc-Fusionsprotein des Originalklons MK220-IG12 für eine zusätzliche Konkurrenz zugegeben, um schon dissoziierten Phagen, die erneute Bindung an VEEV-Partikel zu erschweren. Nach zwei Selektionsrunden wurde die Anreicherung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente beendet, da die niedrigen eluierten Phagenmengen auf eine ausreichende Anreicherung VEEV-bindender scFv hindeuteten. Die Zugabe von 5 μ g scFv-Fc-Fusionsprotein des Originalklons MK220-IG12 in einem Ansatz führte in beiden Selektionsrunden zu niedrigeren eluierten Phagenmengen. Durch Vergleich der eluierten Phagenmenge zeigte sich, dass in der ersten Selektionsrunde ca. 75 Prozent und in der zweiten Runde mehr als 85 Prozent der gebundenen Phagen durch das bindende Fusionsprotein verdrängt wurden. Die anschließende Analyse der zwei Ansätze im polyklonalen Phagen-ELISA zeigte eine effizientere Anreicherung VEEV-spezifischer Antikörperfragmente ohne Zugabe des Fusionsproteins. Dies wurde anschließend durch die Analyse im Antigen-ELISA mit monoklonalen löslichen scFv bestätigt. Die Zugabe des scFv-Fc-Fusionsproteins des Originalklons verlangsamte die Anreicherung virusspezifischer scFv, da theoretisch die Zahl der VEEV-spezifischen Phagen während der Selektionsrunde verringert wurde, während die Zahl der nicht-VEEV-spezifischen Phagen unverändert blieb.

4.2.3 Sequenzvergleich und Charakterisierung der isolierten Antikörperfragmente

Insgesamt wurden zwölf Klone auf Nukleotidsequenzebene analysiert, deren Antikörperfragmente im Antigen-ELISA höhere Signale als das scFv MK220-IG12 ergeben hatten. Darunter wurden neun unterschiedliche Antikörperfragmente identifiziert, von denen fünf aus der Selektion ohne die Zugabe des scFv-Fc-Fusionsproteins, drei aus der Selektion mit der Zugabe und ein Klon aus beiden Selektionen isoliert werden konnten. Die leichten Ketten aller Antikörperfragmente stammten von der Keimbahnlinie IGLV3-1*01 ab. Zudem beinhalteten fast die Hälfte der Antikörperfragmente das J-Genelement IGLJ1*01. Diese Keimbahnlinien entsprechen dem V_L -Gen des Klons

MK220-IG12. Solch eine hohe Repräsentation einer Keimbahnlinie ist bei Selektionen mittels Phagen-Display aus einem naiven Repertoire nicht üblich (Griffiths *et al.*, 1993). Eine am Antikörperfragment beteiligte Lambda-Kette dieser Subfamilie scheint für die Funktionalität des Ursprungsklons essentiell zu sein. Ähnliche Folgen hatte ein V_L -Kettenaustausch bei einem Cytomegalovirus-spezifischen scFv. Hierbei stammten die neu generierten V_L bis auf eine Ausnahme von der gleichen Keimbahnlinie wie die Ursprüngliche ab (Ohlin *et al.*, 1996). Diese Beobachtung stimmt mit der Feststellung überein, dass definierte schwere Ketten bestimmte leichte Ketten zur Bildung von Paratopstrukturen bevorzugen (Barbas *et al.*, 1993; Jaume *et al.*, 1994). Die einzelnen leichten Ketten haben untereinander weder auffällig konservierte noch besonders heterogene Bereiche (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen eluierten Phagenmengen während der Selektion sollte es außer der limitierenden Keimbahnlinie noch weitere Einschränkungen der Art der leichten Kette geben, die wegen der begrenzten Anzahl untersuchter Klone nicht näher eingegrenzt werden konnten. Des Weiteren könnte die Verwendung von β -Propionlaktam-inaktiviertem Virusmaterial eine Verminderung der eluierten Phagenmenge bewirkt haben, da die Inaktivierung der Viren das Oberflächenepitop beeinflusst haben könnte.

Nachdem vergleichbare Produktionsraten der veränderten Antikörperfragmente mittels Immunfärbung der scFv festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt), umfasste der weitere Vergleich ausschließlich die Bindungseigenschaften der scFv im Antigen-ELISA. Durch die Integration einer anderen leichten Kette in ein Antikörperfragment wurde häufig zusätzlich zu einer Veränderung der Bindungskonstante auch die Erkennung eines anderen Epitops beschrieben (Ohlin *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1995). Dieser Effekt erschwert die Auswertung des Vergleichs der generierten Antikörperfragmente, da beide Veränderungen das Ausmaß der Bindung und damit die erhaltenen Signalintensitäten im Antigen-ELISA beeinflussen. Der Nachweis von VEEV-TC83 durch die verschiedenen Abkömmlinge des Klons MK220-IG12 zeigte unterschiedlich hohe Signalintensitäten bei gleicher Virus- und Antikörperfragmentmenge. Die leichte Kette des Klons MK287-IIIG10 scheint hierbei den stärksten positiven Einfluss auf die Erkennung von VEEV-TC83 zu haben. Da die Signalintensitäten sehr nahe beieinander liegen, muss aber in weiteren Untersuchungen verifiziert werden, ob eine wirkliche Verbesserung vorliegt oder es sich um ein gleichwertiges Konstrukt handelt.

4.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des WIS-Antikörpers 8/6 mit VEEV-Partikeln

Zur zukünftigen Bestimmung der Dissoziationskonstante virusspezifischer Antikörper und deren Fragmente wurde eine Methode mit kompletten Viruspartikeln auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz etabliert. Hierzu wurden nach kovalenter Sättigung der Dextranmatrix mit dem Fangantikörper VEEWIS1 Viruspartikel aus Zellkulturüberstand immobilisiert. Nach der Bindung von VEEV aus dem Überstand infizierter Verozellen konnte die Bindung des murinen WIS-Antikörpers 8/6 in verschiedenen Konzentrationen erfolgreich aufgezeichnet werden. Unter Berücksichtigung der molekularen Masse kompletter Viruspartikel erscheint die immobilisierte Proteinmasse (300 RU) zu gering, um ausreichend Epitope für eine detektierbare Bindung des zu analysierenden Antikörpers zu bieten. Weil die erhaltene Bindungskurve des WIS-Antikörpers 8/6 jedoch bis zu ca. 140 RU anstieg, ist von einer ausreichenden Zahl immobilisierter Virusproteine auszugehen. Dies ist bei der geringen immobilisierten Masse nur durch die Beteiligung von beschädigten Viruspartikeln und Bruchstücken mit niedrigeren Molekülmassen aus dem Zellkulturüberstand zu erklären.

Falls es sich wie in diesem Fall um ein bivalentes Bindeereignis handelt, kann eine kinetische Auswertung aufgrund der zwei voneinander abhängigen Bindungen nicht erfolgen. In solchen Fällen sollte die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D aus Gleichgewichtszuständen ermittelt werden. Durch die langsame und sehr ausgeprägte Bindung des WIS-Antikörpers 8/6 ist die Ermittlung der Konstante aufgrund der nur annähernd erreichten Gleichgewichtszustände sicher fehlerbehaftet. Jedoch wurde parallel eine kinetische Auswertung ohne Berücksichtigung der Bivalenz durchgeführt, die ebenfalls eine K_D von $6 \cdot 10^{-9}$ M zum Ergebnis hatte (Daten nicht gezeigt). Die ermittelte K_D erscheint für einen Antikörper, der mittels Hybridomatechnologie generiert wurde, plausibel. So wurden für derartige Antikörper bereits Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich und darunter gemessen (Ben Ghanem *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2005). Im Falle von virusspezifischen Antikörpern wurden bisher Messungen immer unter Verwendung von rekombinanten oder isolierten viralen Proteinen durchgeführt (Park *et al.*, 2006; Sheppard *et al.*, 2007). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Dissoziationskonstante eines Antikörpers anhand seiner Bindung an komplette Viruspartikel bzw. Bruchstücke derselben bestimmt, was der Detektion im realen Einsatz näher kommt.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit optimierten Selektionsstrategien können zukünftige Isolierungen virusspezifischer Antikörper aus universellen Antikörperbibliotheken vereinfachen. Die generierten Antikörperfragmente könnten die spezifische Detektion von VEEV verbessern. Hierzu werden die entsprechenden scFv-Fc-Fusionsproteine in das bestehende Nachweissystem des wehrwissenschaftlichen Instituts integriert werden. Die Berücksichtigung der Antikörperklone aus dem Kettenaustausch (*chain shuffling*) wird in Abhängigkeit ihrer VEEV-Bindungseigenschaft erwogen. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D virusspezifischer Antikörper mittels Oberflächenplasmonresonanz kann zur weiteren Charakterisierung aller isolierten Antikörperfragmente durchgeführt werden. Neben dem Einsatz zur Virusdetektion könnten die in dieser Arbeit generierten und optimierten Antikörperfragmente auch potentiell zu Behandlung von VEEV-Infektionen eingesetzt werden. Die komplett humanen Fusionsproteine aus Antikörperfragmenten und Fc-Region des humanen IgG1 ermöglichen einen Einsatz dieser Moleküle in der Therapie ohne die bei den murinen Antikörpern auftretende Abwehrreaktion (Klee, 2000). Für diese potentielle Anwendung sollte die Fähigkeit der generierten Antikörperfragmente zur Komplementsystem-unabhängigen Virusneutralisierung untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) gehört zu der Gattung Alphavirus. Einige Vertreter dieser Gattung, u.a. VEEV, sind humanpathogen und werden als potentielle biologische Kampfstoffe eingeordnet. Bisher sind nur wenige monoklonale, hochaffine Antikörper gegen diese Viren für die notwendige schnelle Diagnostik und Therapie verfügbar. Ziel dieser Arbeit war die Generierung rekombinanter Antikörperfragmente gegen VEEV aus universellen Antikörpergenbibliotheken zur verbesserten Detektion. Mittels der Phagen-Display-Technologie wurden erstmals virusspezifische Antikörperfragmente durch Selektionen mit kompletten VEEV-Partikeln isoliert. Durch Optimierung der Selektionsstrategien konnten zwölf VEEV-spezifische scFv-Klone aus zwei naiven Antikörpergenbibliotheken isoliert werden. Zur Charakterisierung wurden scFv-präsentierende M13-Phagen dieser Klone produziert und zur Detektion verschiedener Viruspräparationen eingesetzt. Die scFv-präsentierenden Phagen erkannten, eingesetzt als Detektionsantikörper, verschiedene VEEV-Stämme (TC83, H12/93 und 230), jedoch keine anderen Arten der Alphaviren (EEEV, WEEV und Chikugunyavirus). Der vielseitige und hochsensitive Einsatz von scFv-präsentierenden Phagen zur Virusdetektion wurde in dieser Arbeit erstmals demonstriert. Neben den scFv-präsentierenden Phagen wurden von den isolierten Antikörperfragmenten bivalente scFv-Fc-Fusionsproteine erzeugt. Mittels Immunfärbungen wurde gezeigt, dass strukturelle Epitope von den scFv-präsentierenden Phagen und den scFv-Fc-Fusionsproteinen erkannt wurden. Diese Strukturen konnten im Lysat mittels ELISA und auf der Zelloberfläche VEEV-infizierter Zellen mittels Immunhistochemie spezifisch nachgewiesen werden.

Das generierte humane Antikörperfragment MK220-IG12 wurde hinsichtlich seiner Erkennungseigenschaften von VEEV mittels Kettenaustausch der variablen Domäne der leichten Antikörperkette durch Phagen-Display optimiert. Mehrere Binder konnten isoliert werden, die verbesserte Bindungseigenschaften an VEEV zeigten. In der weiteren Analyse zeigte der Klon MK287-IIIG10 die beste Eignung zum Nachweis von VEEV.

In dieser Arbeit konnten erstmals hochspezifische Antikörperfragmente aus naiven Antikörpergenbibliotheken durch Optimierung der Selektion mit kompletten Viruspartikeln isoliert werden. Die generierten humanen Antikörperfragmente könnten die schnelle Identifikation und Detektion von VEEV verbessern, sowie potentiell zur Therapie von VEEV-Infektionen eingesetzt werden.

Summary

Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) belongs to the Alphavirus genus. Several species of this genus, e.g. VEEV, are pathogenic to humans and are classified as potential agent of biological warfare and terrorism. Monoclonal highly affine antibodies against viruses of this group are rare for rapid diagnostic procedures and therapy. The aim of this work was the generation of recombinant antibody fragments against VEEV from universal antibody gene libraries for an improved detection. Virus specific scFv were isolated with selection strategies on whole VEEV particles using phage display for the first time. By optimisation of the selection strategy twelve VEEV specific scFv could be isolated from two naïve libraries. Monoclonal scFv presenting phage of the obtained antibody fragments were produced for characterisation and used for detection of several virus preparations. Used as detection antibodies, the scFv presenting phage were specific for VEEV strains (TC83, H12/93 and 230) and did not show any cross-reactivity with other species of the alphaviruses (EEEV, WEEV and Chikugunya virus). In this study the broad und sensitive approach of scFv presenting phage for virus detection was demonstrated for the first time. Bivalent scFv-Fc fusion proteins of the isolated antibody fragments were additionally generated. Immunostains of VEEV proteins demonstrated the recognition of structural epitopes by the scFv presenting phage and the scFv-Fc fusion proteins. These structures were detected specifically in the lysate by ELISA and on the surface of VEEV infected Vero cells by immunohistochemistry.

The human antibody fragment MK220-IG12 was additionally improved for recognition of VEEV by chain shuffling of the variable domain of the antibody light chain using phage display. Some of the isolated binders showed improved properties for binding to VEEV. The clone MK287-IIIG10 was best suited for detection of VEEV in the following analysis. This study describes a new successful isolation of highly specific antibody fragments from naïve antibody gene libraries by optimization of selections with whole virus particles. The generated human antibody fragments could improve the fast identification and diagnosis of VEEV and will be potentially used in the therapy of VEEV infections.

6 Literaturverzeichnis

Abe M, Ozaki S, Wolfenbarger D, de Bram-Hart M, Weiss DT, Solomon A. Variable-region subgroup distribution among λ -type immunoglobulins in normal human serum. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8 (1): 4-9.

Alvi AZ, Hu WG, Fulton RE, Coles JE, Long MC, Nagata LP. Functional enhancement of a partially active single-chain variable fragment antibody to Venezuelan equine encephalitis virus. *Viral Immunol.* 2003;16 (2): 213-22.

Alvi AZ, Stadnyk LL, Nagata LP, Fulton RE, Bader DE, Roehrig JT, Suresh MR. Development of a functional monoclonal single-chain variable fragment antibody against Venezuelan equine encephalitis virus. *Hybridoma.* 1999; 18 (5): 413-21.

Alzari PM, Spinelli S, Mariuzza RA, Boulot G, Poljak RJ, Jarvis JM, Milstein C. Three-dimensional structure determination of an anti-2-phenyloxazolone antibody: the role of somatic mutation and heavy/light chain pairing in the maturation of an immune response. *EMBO J.* 1990; 9 (12): 3807-14.

Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman, GJ. *Phage Display: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Barbas III CF, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, Cababa D, Jones TM, Williamson RA, Pilkington GR, et al. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol.* 1993; 230 (3): 812-23.

Barbas III CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88 (18): 7978-82.

Beck CE, Wyckoff RWG. Venezuelan equine encephalomyelitis. *Science.* 1938; 88: 530.

Ben Ghanem A, Pallu S, Winchenne JJ, Raymonjean N, Mayeux P, Goossens D, Boffa GA, Casadevall N, Cartron JP, Lambin P. Preparation and biological properties of monoclonal antibodies against human erythropoietin. *Hybridoma.* 1993; 12 (5): 599-608.

Berge TO, Banks IS, Tigertt WD. Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells. *Am J Hyg.* 1961; 73: 209-218.

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science.* 1988; 242 (4877): 423-6.

Blaise L, Wehnert A, Steukers MP, van den Beucken T, Hoogenboom HR, Hufton SE. Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene.* 2004; 342 (2): 211-8.

Blue Book. US Army Medical Research Institute of Infectious Disease (USAMRIID). 6. Auflage. 2005.

Im Internet: [http://www.usamriid.army.mil/education/bluebookpdf/USAMRIID BlueBook 6th Edition - Sep 2006.pdf](http://www.usamriid.army.mil/education/bluebookpdf/USAMRIID%20BlueBook%206th%20Edition%20-%20Sep%202006.pdf)

Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene.* 1991; 104 (2): 147-53.

Burke DS, Ramsburg HH, Edelman R. Persistence in humans of antibody to subtypes of Venezuelan equine encephalomyelitis (VEE) virus after immunization with attenuated (TC-83) VEE virus vaccine. *J Infect Dis.* 1977 Sep;136 (3): 354-9.

Casals J, Curnen EC, Thomas L. Venezuelan equine encephalomyelitis in man. *J Exp Med* 1943; 77: 521-530.

Chen C, Patel S, Corisdeo S, Liu X, Micolochick H, Xue J, Yang Q, Lei Y, Wang B, Soltis D. Generation and characterization of a panel of monoclonal antibodies specific for human fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4). *Hybridoma (Larchmt).* 2005; 24 (3): 152-9.

Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 1991; 352 (6336): 624-8.

Dalrymple JM, Schlesinger S, Russell PK. Antigenic characterization of two Sindbis envelope glycoproteins separated by isoelectric focusing. *Viol.* 1976; 69: 93-103

De Carvalho Nicacio C, Williamson RA, Parren PW, Lundkvist A, Burton DR, Björling E. Neutralizing human Fab fragments against measles virus recovered by phage display. *J Virol.* 2002; 76 (1): 251-8.

Donà MG, Giorgi C, Accardi L. Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer.* 2007; 7: 25.

Duan J, Ji X, Feng J, Han W, Zhang P, Cao W, Guo X, Qi C, Yang D, Jin G, Gao G, Yan X. A human neutralizing antibody against a conformational epitope shared by oligomeric SARS S1 protein. *Antivir Ther.* 2006; 11 (1): 117-23.

Duggan JM, Coates DM, Ulaeto DO. Isolation of single-chain antibody fragments against Venezuelan equine encephalomyelitis virus from two different immune sources. *Viral Immunol.* 2001; 14 (3): 263-73.

Ferguson JA, Reeves WC, Milby MM, Hardy JL. Study of homologous and heterologous antibody response in California horses vaccinated with attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine (strain TC-83). *Am J Vet Res.* 1978; 39 (3): 371-6.

Finlay WJ, Shaw I, Reilly JP, Kane M. Generation of high-affinity chicken single-chain Fv antibody fragments for measurement of the *Pseudonitzschia pungens* toxin domoic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72 (5): 3343-9.

Frolov IV, Kolykhalov AA, Volchakov VE, Netesov SV, Sandakhchiev LS. [Comparison of the amino acid sequence of structural proteins from attenuated and pathogenic strains of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus] [Article in Russian]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1991; 318 (6): 1488-91.

Goldsmith ME, Konigsberg WH. Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties, and location in the virus. *Biochemistry.* 1977; 16 (12): 2686-94.

Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, Blohm D, Tomlinson I, Winter G, Karsten U. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol.* 2002; 315 (5): 1087-97.

Greiser-Wilke IM, Moennig V, Kaaden OR, Shope RE. Detection of alphaviruses in a genus-specific antigen capture enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1991 Jan;29 (1): 131-7.

Griep RA, Prins M., van Twist C, Keller HJHG, Kerschbaumer RJ, Kormelink R, Goldbach RW, Schots A. Application of phage display in Selecting Tomato spotted wilt virus-Specific Single-Chain Antibodies (scFvs) for Sensitive Diagnosis in ELISA. *Phytopathology.* 2000; 90: 183-190.

Griffin DE,. Alphaviruses in Fields Virology 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2004.

Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC, et al.. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 1993 Feb; 12 (2): 725-34.

Guo YC, Zhou YF, Zhang XE, Zhang ZP, Qiao YM, Bi LJ, Wen JK, Liang MF, Zhang JB. Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34 (8): e62.

Hanes J, Schaffithel C, Knappik A, Plückthun A. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol.* 2000; 18 (12): 1287-92

Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol.* 1992; 226 (3): 889-96.

Hawley RJ, Eitzen EM. Biological weapons--a primer for microbiologists. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 235-53.

Hayashi N, Welschoff M, Zewe M, Braunagel M, Dübel S, Breitling F, Little M. Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *Biotechniques* 1994; 17: 310-316.

Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19 (15): 4133-7.

Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 2003; 21 (11): 484-90.

Hu WG, Thompson HG, Alvi AZ, Nagata LP, Suresh MR, Fulton RE. Development of immunofiltration assay by light addressable potentiometric sensor with genetically biotinylated recombinant antibody for rapid identification of Venezuelan equine encephalitis virus. *J Immunol Methods.* 2004; 289 (1-2): 27-35

Hu WG, Alvi AZ, Chau D, Coles JE, Fulton RE, Suresh MR, Nagata LP. Development and characterization of a novel fusion protein composed of a human IgG1 heavy chain constant region and a single-chain fragment variable antibody against Venezuelan equine encephalitis virus. *J Biochem (Tokyo).* 2003; 133 (1): 59-66.

Hu WG, Alvi AZ, Fulton RE, Suresh MR, Nagata LP. Genetic engineering of streptavidin-binding peptide tagged single-chain variable fragment antibody to Venezuelan equine encephalitis virus. *Hybrid Hybridomics.* 2002; 21 (6): 415-20.

Huie MA, Cheung MC, Muench MO, Becerril B, Kan YW, Marks JD. Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98 (5): 2682-7.

Huls G, Gestel D, van der Linden J, Moret E, Logtenberg T. Tumor cell killing by in vitro affinity-matured recombinant human monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 2001; 50 (3): 163-71.

Hunt AR, Frederickson S, Hinkel C, Bowdish KS, Roehrig JT. A humanized murine monoclonal antibody protects mice either before or after challenge with virulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Gen Virol.* 2006; 87 (Pt 9): 2467-76.

Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, Kirsch MI, Meier D, Dübel S. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol.* 2007a; 7: 14.

Hust M, Toleikis L, and Dübel S. Antibody phage display. Handbook of therapeutic antibodies. Ed. Dübel S. Willey-VCH. 2007b, 45-68.

Hust M, Dübel S, Schirrmann T. Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. Gene Function Analysis. Ed: Ochs MF. Meth. Mol. Biol. 2007c; 408: 241-254.

Hust M, Maiss E, Jacobsen HJ, Reinard T. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. J Virol Methods. 2002; 106 (2): 225-33.

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, *et al.*. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85 (16): 5879-83.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. 5. Auflage Spektrum Akademischer Verlag. 2002.

Jaume JC, Costante G, Portolano S, McLachlan SM, Rapoport B. Recombinant thyroid peroxidase-specific autoantibodies. I. How diverse is the pool of heavy and light chains in immunoglobulin gene libraries constructed from thyroid tissue-infiltrating plasma cells. Endocrinology. 1994; 135 (1): 16-24.

Jaspers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van den Brande I, Gansemans YG, Lauwereys MJ, Vlasuk GP, Stanssens PE. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. Biotechnology (N Y). 1995; 13 (4): 378-82.

Kato T, Sato K, Suzuki S, Sasakawa H, Kurokawa M, Nishioka K, Yamamoto K. Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions. Mol Biol Rep. 1995; 21 (3): 141-6.

Kim SJ, Jang MH, Stapleton JT, Yoon SO, Kim KS, Jeon ES, Hong HJ. Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by phage display. Virology. 2004; 318 (2): 598-607.

- Kinney RM, Chang GJ, Tsuchiya KR, Sneider JM, Roehrig JT, Woodward TM, Trent DW. Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J Virol.* 1993; 67 (3): 1269-77.
- Kinney RM, Trent DW, France JK. Comparative immunological and biochemical analyses of viruses in the Venezuelan equine encephalitis complex *J Gen Virol* 1983; 64: 135-147.
- Kirsch M, Zaman M, Meier D, Dübel S, Hust M. Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods.* 2005; 301 (1-2): 173-85.
- Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124 (6): 921-3.
- Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellenhofer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol.* 2000; 296 (1): 57-86.
- Koch J, Liang M, Queitsch I, Kraus AA, Bautz EK. Human recombinant neutralizing antibodies against hantaan virus G2 protein. *Virology.* 2003; 308 (1): 64-73.
- Kubes V, Rios FA. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 1939; 90: 20-21.
- Kuepper MB, Huhn M, Spiegel H, Ma JK, Barth S, Fischer R, Finnern R. Generation of human antibody fragments against *Streptococcus mutans* using a phage display chain shuffling approach. *BMC Biotechnol.* 2005; 5: 4.
- Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol.* 1987; 169 (9): 4379-83.
- Leitenberg M. Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2001; 27 (4): 267-320.
- Luers AJ, Adams SD, Smalley JV, Campanella JJ. A Phylogenomic Study of the Genus Alphavirus Employing Whole Genome Comparison. *Comparative and Functional Genomics.* 2005; 6 (4): 217-227.

Luginbühl B, Kanyo Z, Jones RM, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE, Williamson RA, Burton DR, Plückthun A. Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation. *J Mol Biol.* 2006; 363 (1): 75-97.

Malik P, Terry TD, Gowda LR, Langara A, Petukhov SA, Symmons MF, Welsh LC, Marvin DA, Perham RN. Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. *J Mol Biol.* 1996; 260 (1): 9-21.

Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson T, Bye JM, Winter G. Bypassing immunisation: high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology.* 1992; 10: 779-783.

Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 1991; 222 (3): 581-97.

Mathews JH, Roehrig JT. Determination of the protective epitopes on the glycoproteins of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by passive transfer of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 129: 2763-2767.

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990; 348 (6301): 552-4.

O'Brien P, Aitken R. *Antibody Phage Display.* Humana Press. 2002.

Ohlin M, Owman H, Mach M, Borrebaeck CA. Light chain shuffling of a high affinity antibody results in a drift in epitope recognition. *Mol Immunol.* 1996; 33 (1): 47-56.

Paredes A, Alwell-Warda K, Weaver SC, Chiu W, Watowich SJ. Venezuelan equine encephalomyelitis virus structure and its divergence from old world alphaviruses. *J Virol.* 2001; 75 (19): 9532-7.

Park SG, Jung YJ, Lee YY, Yang CM, Kim Ig activity of human scFv antibodies against hepatitis B virus binding using CDR3 V(H) mutant library. *Viral Immunol.* 2006; 19 (1): 115-23.

Park SG, Jeong YJ, Lee YY, Kim IJ, Seo SK, Kim EJ, Jung HC, Pan JG, Park SJ, Lee YJ, Kim IS, Choi IH. Hepatitis B virus-neutralizing anti-pre-S1 human antibody fragments from large naïve antibody phage library. *Antiviral Res.* 2005; 68 (3): 109-15.

Park SG, Lee JS, Je EY, Kim IJ, Chung JH, Choi IH. Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275 (2): 553-7.

Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 1988; 73 (2): 305-18.

Pavlinkova G, Colcher D, Booth BJ, Goel A, Wittel UA, Batra SK. Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs. *Int J Cancer.* 2001; 94 (5): 717-26.

Pedersen CE Jr, Eddy GA. Separation, isolation, and immunological studies of the structural proteins of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol.* 1974 (4):740-4.

Phillpotts RJ, Jones LD, Howard SC. Monoclonal antibody protects mice against infection and disease when given either before or up to 24 h after airborne challenge with virulent Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine.* 2002; 20 (11-12): 1497-504.

Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem.* 1998; 273 (34): 21769-76.

Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, Weaver SC. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol.* 2001; 75 (21): 10118-31.

Powers AM, Oberste MS, Brault AC, Rico-Hesse R, Schmura SM, Smith JF, Kang W, Sweeney WP, Weaver SC. Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J Virol.* 1997; 71 (9): 6697-705.

Razumov IA, Agapov EV, Pereboev AV, Protopopova EV, Lebedeva SD, Loktev VB. [Study of the antigenic structure of the E1 glycoprotein of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus using monoclonal antibodies] [Article in Russian]. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 1991; (6): 21-4.

Retter I, Althaus HH, Münch R, Müller W. VBASE2, an integrative V gene database. Nucleic Acids Res. 2005; 33 (Database issue): D671-4.

Reed DS, Lind CM, Sullivan LJ, Pratt WD, Parker MD. Aerosol infection of cynomolgus macaques with enzootic strains of venezuelan equine encephalitis viruses. J Infect Dis. 2004; 189(6): 1013-7.

Rivas F, Diaz LA, Cardenas VM, Daza E, Bruzon L, Alcala A, De la Hoz O, Canceres FM, Aristizabal G, Martinez JW, Revelo D, De la Hoz F, Boshell J, Camacho T, Calderon L, Olano VA, Villareal LI, Roselli D, Alvarez G, Ludwig G, Tsai T. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira Colombi, 1995. J Inf Dis. 1997; 175: 828.

Rodríguez-Díaz J, Monedero V, Pérez-Martínez G, Buesa J. Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display. J Virol Methods. 2004; 121 (2): 231-8.

Roehrig JT, Mathews JH. The neutralization site on the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalomyelitis (TC-83) virus is composed of multiple conformationally stable epitopes. Virology. 1985; 142 (2): 347-56.

Roehrig JT, Day JW, Kinney RM. Antigenic analysis of the surface glycoproteins of a Venezuelan equine encephalomyelitis virus (TC-83) using monoclonal antibodies. Virology. 1982; 118 (2): 269-78.

Roehrig JT, Corser JA, Schlesinger MJ. Isolation and characterization of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies directed against the structural proteins of Sindbis virus. Virology. 1980; 101 (1): 41-9.

Rondot S, Koch J, Breitling F, Dübel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. Nat Biotechnol. 2001; 19 (1): 75-8.

Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med*. 1995; 181 (4): 1557-61.

Sambrook J, Russell DW. In *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

Sanchez JL, Takafuji ET, Lednar WM, LeDuc JW, Macasaet FF, Mangiafico JA, Rosato RR, Driggers DP, Haecker JC. Venezuelan equine encephalomyelitis: Report of an outbreak associated with jungle exposure. *Mil Med* 1984; 149: 618

Schier R, Bye J, Apell G, McCall A, Adams GP, Malmqvist M, Weiner LM, Marks JD. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol*. 1996; 255 (1): 28-43.

Sheppard NC, Davies SL, Jeffs SA, Vieira SM, Sattentau QJ. Production and characterization of high-affinity human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in a mouse model expressing human immunoglobulins. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14 (2): 157-67.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228 (4705): 1315-7.

Soltes G, Hust M, Ng KK, Bansal A, Field J, Stewart DI, Dübel S, Cha S, Wiersma EJ. On the influence of vector design on antibody phage display. *J Biotechnol*. 2007; 127 (4): 626-37.

Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*. 1994; 58 (3): 491-562.

Toleikis L. Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. 2003.

Uhde K, Kerschbaumer RJ, Koenig R, Hirschl S, Lemaire O, Boonham N, Roake W, Himmeler G. Improved detection of Beet necrotic yellow vein virus in a DAS ELISA by means of antibody single chain fragments (scFv) which were selected to protease-stable epitopes from phage display libraries. *Arch Virol*. 2000; 145 (1): 179-85.

- Van den Brink EN, Ter Meulen J, Cox F, Jongeneelen MA, Thijsse A, Throsby M, Marissen WE, Rood PM, Bakker AB, Gelderblom HR, Martina BE, Osterhaus AD, Preiser W, Doerr HW, de Kruif J, Goudsmit J. Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2005; 79 (3): 1635-44.
- Velappan N, Martinez JS, Valero R, Chasteen L, Ponce L, Bondu-Hawkins V, Kelly C, Pavlik P, Hjelle B, Bradbury AR. Selection and characterization of scFv antibodies against the Sin Nombre hantavirus nucleocapsid protein. *J Immunol Methods*. 2007; 321 (1-2): 60-9.
- Vieira J, Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol*. 1987; 153: 3-11.
- Wang YA, Yu X, Overman S, Tsuboi M, Thomas GJ Jr, Egelman EH. The structure of a filamentous bacteriophage. *J Mol Biol*. 2006; 361 (2): 209-15.
- Ward ES, Ghetie V. The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol*. 1995; 2 (2): 77-94.
- Ward ES. VH shuffling can be used to convert an Fv fragment of anti-hen egg lysozyme specificity to one that recognizes a T cell receptor V alpha. *Mol Immunol*. 1995; 32 (2): 147-56.
- Ward ES, Güssow D, Gritthiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*. 1989; 341, 544-546
- Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, Tesh RB. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. VEE Study Group. *Lancet*. 1996; 348 (9025): 436-40.
- Wilkinson KA, Belisle JT, Mincek M, Wilkinson RJ, Toossi Z. Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *J Immunol Methods*. 2000; 235 (1-2): 1-9.

Zhang W, Mukhopadhyay S, Pletnev SV, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. Placement of the structural proteins in Sindbis virus. J Virol. 2002; 76 (22): 11645-11658.

7 Anhang

7.1 Zusätzliche Daten

7.1.1 Vektorkarten

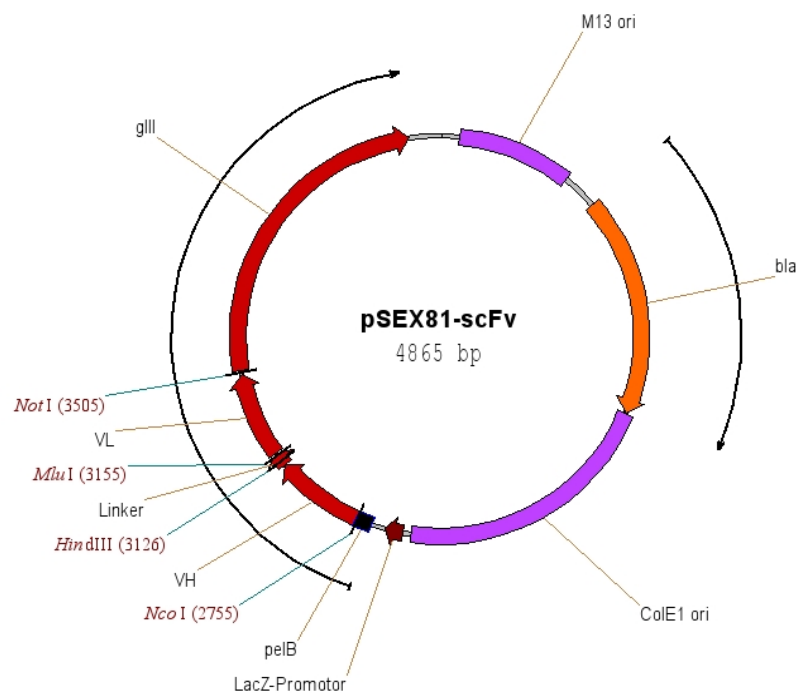


Abb. 7.1: Vektorkarte von pSEX81-scFv

Karte des Vektors pSEX81 mit scFv-Gen und den Abkürzungen: pelB: Signalpeptidsequenz; VH: Gen der variablen Region der schweren Kette; Linker: Peptidlinkersequenz; VL: Gen der variablen Region der leichten Kette; gIII: Gen des Phagenproteins pIII; bla: β -Laktamase-Gen; M13 ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*; Col-E1-ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*

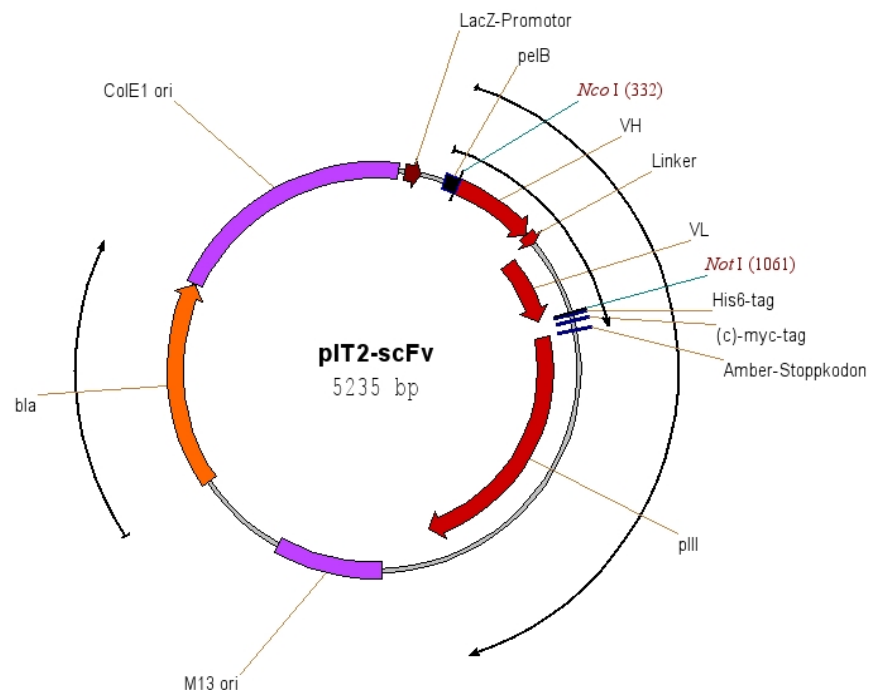


Abb. 7.2: Vektorkarte von pT2-scFv

Karte des Vektors pT2 mit scFv-Gen und den Abkürzungen: pelB: Signalpeptidsequenz, VH: Gen der variablen Region der schweren Kette; Linker: Peptidlinkersequenz; VL: Gen der variablen Region der leichten Kette; His6-tag: cDNA für His₆; (c)-myc-tag: cDNA für (c)-myc; gIII: Gen des Phagenproteins pIII; ochre: Ochre-Stoppkodon; M13 ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*; bla: β -Laktamase-Gen.

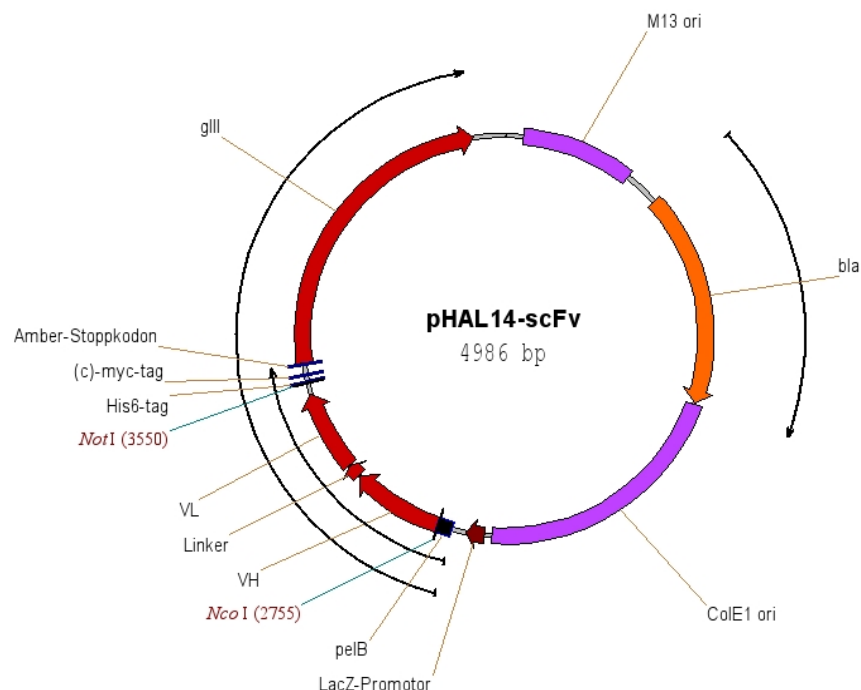


Abb. 7.3: Vektorkarte von pHAL14-scFv

Karte des Vektors pHAL14 mit scFv-Gen und den Abkürzungen: pelB: Signalpeptidsequenz, VH: Gen der variablen Region der schweren Kette; Linker: Peptidlinkersequenz; VL: Gen der variablen Region der leichten Kette; His6-tag: cDNA für His₆; (c)-myc-tag: cDNA für (c)-myc; gIII: Gen des Phagenproteins pIII; ochre: Ochre-Stoppkodon; M13 ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*; bla: β -Laktamase-Gen.

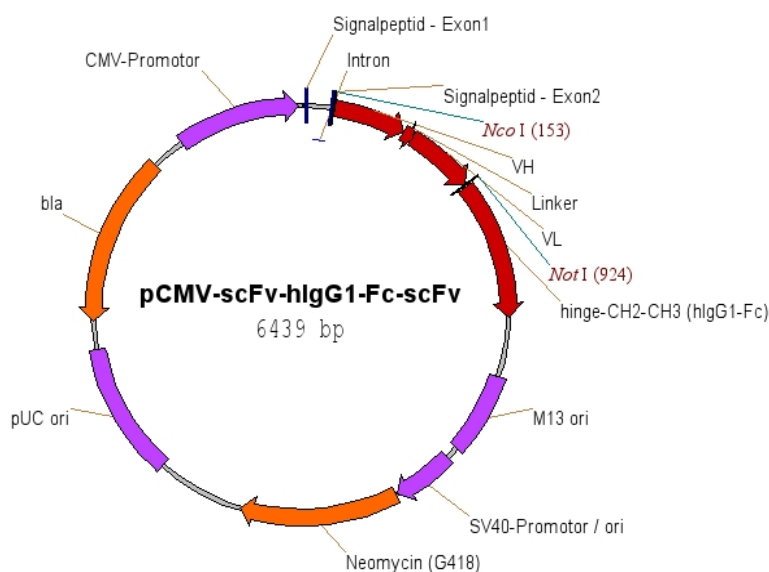


Abb. 7.4: Vektorkarte von pCMV-hlgG1-Fc-scFv

Karte des Vektors pCMV-hlgG1-Fc-XP mit scFv-Gen und den Abkürzungen: CMV-Promotor: *CMV early immediate promoter*; VH: Gen der variablen Region der schweren Kette; Linker: Peptidlinkersequenz; VL: Gen der variablen Region der leichten Kette; hinge-CH2-CH3 (hlgG1-Fc): Gen für konstante und *hinge*-Region des scFv-Fc-Fusionsproteins; M13 ori: Replikationsursprung für M13/ *E. coli*; Neomycin: Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Replikationsursprung für *E. coli*; bla: β-Laktamase-Gen. Auf die Darstellung der offenen Leseramen wurde aufgrund der in denen Genen integrierten Introns verzichtet.

7.1.2 Keimbahnlinien der scFv aus den Antikörpergenbibliotheken Heidelberg und Tomlinson (I+J)

Tab. 7.1: Keimbahnlinien der VEEV-spezifischen scFv-Gene der Antikörpergenbibliotheken Tomlinson (I+J) und Heidelberg
Die Abkürzung inv zeigt die Beteiligung eines inversen Gensegments an.

| Klon | VH | | | VL | |
|------------------------------------|-------------|--------------|----------|--------------|----------|
| | HV | HD | HJ | LV | LJ |
| Klone aus der Bibliothek Tomlinson | IGHV3-23*01 | IGHD6-6*01 | IGHJ4*02 | IGKV1D-39*01 | IGKJ1*01 |
| MK220-IB11 | IGHV3-23*01 | IGHD5-5*01 | IGHJ4*02 | IGKV1-27*01 | IGKJ3*01 |
| MK220-IG12 | IGHV3-23*01 | IGHD3-16*01 | IGHJ4*02 | IGLV3-1*01 | IGLJ1*01 |
| MK220-IIB10 | IGHV3-23*01 | IGHD6-25*01i | IGHJ4*02 | IGLV2-14*04 | IGLJ3*02 |
| MK220-IIF10 | IGHV1-2*02 | IGHD2-15*01 | IGHJ4*02 | IGLV1-47*01 | IGLJ3*02 |
| MK220-IIG4 | IGHV3-30*18 | IGHD3-10*01 | IGHJ4*02 | IGLV1-47*01 | IGLJ2*01 |

7.1.3 Phagentiter der monoklonalen Phagenpräparationen

Tab. 7.2: Phagentiter der monoklonalen Phagenpräparationen

| Phagenpräparation Charge 1 | | Phagenpräparation Charge 2 | |
|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| Klon/ Antikörperfragment | Titer [cfu/mL] | Klon/ Antikörperfragment | Titer [cfu/mL] |
| MK271-G2 | $7,4 \cdot 10^{12}$ | MK271-G2 | $1,3 \cdot 10^{12}$ |
| CHN24-2-A1 | $2,4 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-A1 | $1,4 \cdot 10^{13}$ |
| CHN24-2-A2 | $1,2 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-A2 | $1,2 \cdot 10^{13}$ |
| CHN24-2-B7 | $3,4 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-B7 | $2,1 \cdot 10^{13}$ |
| CHN24-2-C2 | $1,9 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-C2 | $2,2 \cdot 10^{13}$ |
| CHN24-2-C3 | $3,8 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-C3 | $7,0 \cdot 10^{12}$ |
| CHN24-2-D5 | $2,4 \cdot 10^{13}$ | CHN24-2-D5 | $9,6 \cdot 10^{12}$ |
| CHN24-2-F11 | $3,0 \cdot 10^{12}$ | CHN24-2-F11 | $1,6 \cdot 10^{13}$ |
| MK269-C10 | $1,2 \cdot 10^{13}$ | MK269-C10 | $1,3 \cdot 10^{13}$ |
| MK269-E11 | $4,6 \cdot 10^{12}$ | MK269-E11 | $3,1 \cdot 10^{13}$ |
| MK269-E12 | $5,6 \cdot 10^{12}$ | MK269-E12 | $3,6 \cdot 10^{13}$ |
| MK220-IG12 | $1,1 \cdot 10^{13}$ | MK220-IG12 | $1,2 \cdot 10^{13}$ |
| IIB6 | $2,6 \cdot 10^{12}$ | IIB6 | $5,6 \cdot 10^{12}$ |

7.1.4 Antigen-ELISA mit inaktiviertem VEEV-TC83

Die Durchführung des Antigen-ELISA mit VRS-konzentriertem, inaktiviertem VEEV-TC83 erfolgte analog des in 3.3.2 beschriebenen ELISA. Da die zwei Chargen der scFv-präsentierenden Phagen mittels zwei unabhängiger Antigen-ELISA mit Formalin-inaktiviertem Virusantigen analysiert worden waren, wurden die Werte nicht zu Doppelbestimmungen zusammengefasst.

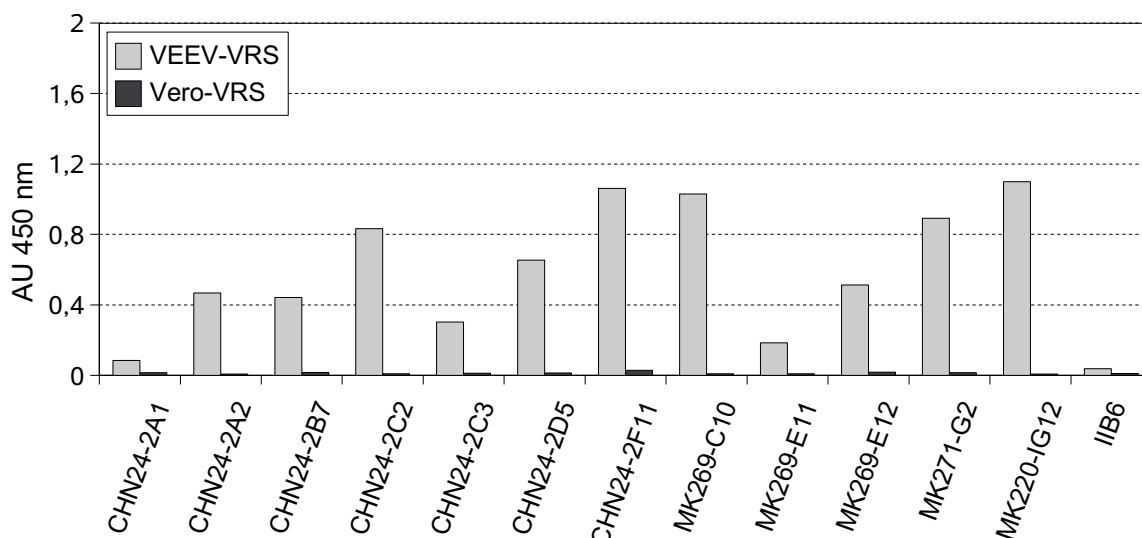


Abb. 7.5: Antigen-ELISA mit inaktiviertem VEEV-TC83

1 µg VEEV-TC83-VRS und Vero-VRS wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin, das Absättigen mit 2 % MPBST. Es wurden 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen der Charge 1 pro Kavität inkubiert. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB.

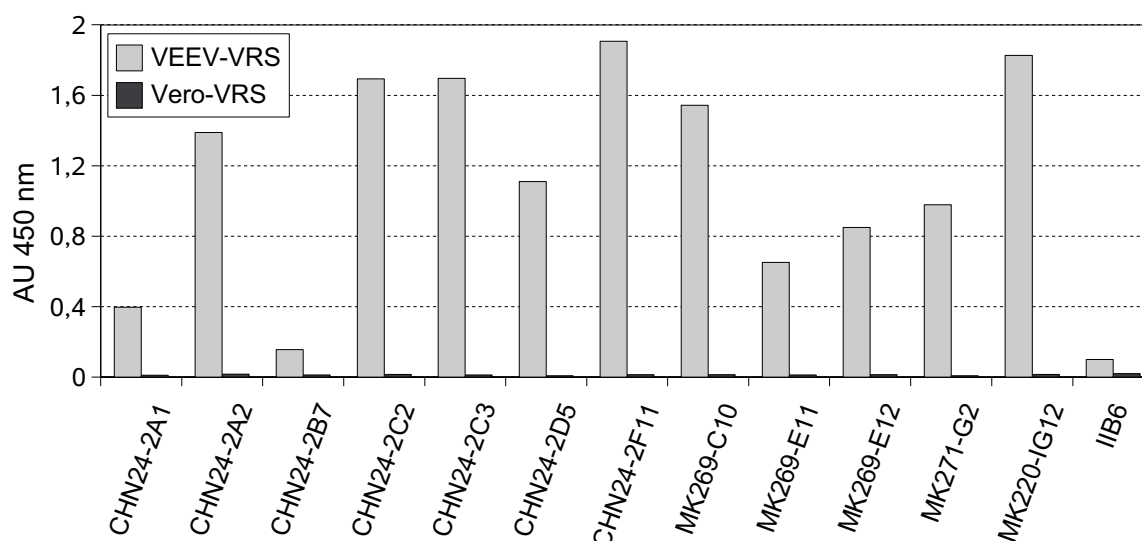


Abb. 7.6: Antigen-ELISA mit inaktiviertem VEEV-TC83

1 µg VEEV-TC83-VRS und Vero-VRS wurden adsorptiv immobilisiert. Die VEEV-Inaktivierung erfolgte mit Formalin, das Absättigen mit 2 % MPBST. Es wurden 10^9 cfu scFv-präsentierende Phagen der Charge 2 pro Kavität inkubiert. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels des Ak Anti-M13-POD (1:5000) und mit dem Substrat TMB.